

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DE QUIMIORRESISTÊNCIA EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS  
AGUDAS**

CAMILA ALVES DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

2017

**CAMILA ALVES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DE QUIMIORRESISTÊNCIA EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS  
AGUDAS**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular da  
Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

2017

## **Agradecimentos**

*Agradeço, primeiramente, a minha família que nunca me deixou fraquejar diante das dificuldades e pela paciência e apoio incondicional.*

*Agradeço ao meu namorado, que se manteve ao meu lado oferecendo seu apoio, incondicional.*

*Agradeço às colegas, em especial as amigas Kelly, Mirela e Danielly que foram meu porto seguro em cada experimento e experiência vivida dentro e fora do laboratório.*

*Agradeço ao Professor e Orientador Rafael Roesler pela oportunidade e orientação incentivando e apoiando em cada momento.*

*Agradeço a Doutora Caroline Brunetto Farias, pelo auxílio em todos os momentos de necessidade, sendo solícita e acolhedora.*

*Por fim, agradeço a todos que de alguma forma me inspiram a fazer a diferença no âmbito científico e social.*

## Índice

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Câncer .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Leucemias Agudas .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Tratamento: Quimioterapia .....	15
<b>1.3 Resistência Tumoral .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Quimiorresistência e Quimiossensibilidade .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Kit ChemoBiogram .....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>3. CAPÍTULO I .....</b>	<b>24</b>
Development and validation of methods for evaluating chemoresistance in acute leukemias .....	24
<b>4. CAPITULO II .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
4.2.2 Critérios de Inclusão de Pacientes .....	44
4.2.3 Coleta de Sangue e Medula Óssea .....	44
4.2.4 Cultura Primária de Leucemias Mieloide e Linfoide Agudas	45
4.2.5 Compostos Químicos .....	45
4.2.6 Métodos de Avaliação de Viabilidade e Celular .....	46
4.2.7Avaliação de resultados .....	46
<b>4.3 RESULTADOS PRELIMINARES.....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Caso 1 .....	46
4.3.2 Caso 2 .....	48
4.3.2 Caso 3 .....	50

4.3.4 Caso 4_ .....	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
6 PERSPECTIVAS.....	56
CURRICULUM VITAE .....	61
ANEXOS .....	65
Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido .....	65

## **Lista de abreviaturas**

**IARC:** Do inglês *International agency for research on cancer*

**NCCN:** Do inglês *National Comprehensive Cancer Network*

**LLA:** Leucemia linfóide aguda

**LMA:** Leucemia mieloide aguda

**HPLC:** Do inglês *High performance liquid chromatography*

**SNC:** Sistema nervoso central

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação das taxas de incidência total de câncer por 100mil habitantes para o ano de 2016.

**Figura 2:** Hematopoiese: As células do sangue são derivadas de progenitores multipotenciais. Alterações na sua formação podem levar ao desenvolvimento de leucemias.

**Figura 3:** Crescimento celular normal versus crescimento de células tumorais.

**Figura 4:** Esquema representativo dos múltiplos fatores envolvidos na resistência quimioterápica.

**Figura 5:** Avaliação de quimiorresistência do paciente PLB, em amostra de sangue periférico no momento da recidiva

**Figura 6:** Avaliação de quimiorresistência do paciente GOK, em amostra de medula óssea no momento do diagnóstico

**Figura 7:** Avaliação de quimiorresistência do paciente GOK, em amostra de medula óssea após tratamento de indução.

**Figura 8:** Avaliação de quimiorresistência do paciente GOK, em amostra de medula óssea após 5 meses de tratamento

**Figura 9:** Avaliação de quimiorresistência do paciente KRB, em amostra de medula óssea no momento do diagnóstico.

**Figura 10:** Avaliação de quimiorresistência do paciente KRB, em amostra de medula óssea após tratamento de indução

**Figura 11:** Avaliação de quimiorresistência do paciente WICCS, em amostra de sangue periférico no momento da recidiva.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Quimioterápicos mais comuns para tratamentos de Leucemias Mieloide e Linfoide Agudas, segundo NCCN 2017.

**Tabela 2:** Valor preditivo de testes para avaliação de resistência a drogas



## RESUMO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo sendo a quimioterapia parte fundamental no tratamento, constituindo-se muitas vezes na única opção de cura para os pacientes. Entretanto, progressão de doença e morte ainda são problemas resultantes de resistência intrínseca e adquirida às drogas. Com o intuito de melhorar a resposta aos tratamentos e a sobrevida dos indivíduos, sistemas de avaliação de resposta a drogas vêm sendo testados para determinar a potencial atividade das drogas antes da sua administração aos pacientes. O ChemoBiogram é o primeiro kit para avaliação de quimiorresistência *in vitro*, buscando solucionar problemas de manipulação de quimioterápicos e degradação e extravio de amostras. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho é avaliar a quimiorresistência em leucemias agudas, utilizando como ferramenta o kit. Para isso foi avaliada a integridade e ação biológica das drogas sobre células leucêmicas utilizando linhagens celulares de LLA e LMA, assim como em cultivos primários a partir de amostras de medula óssea. Os padrões dos fármacos de interesse foram padronizados por HPLC e tiveram seu IC50 determinado utilizando as linhagens HL60 e Jurkat. As drogas foram liofilizadas em diferentes doses na placa de 96 poços. A estabilidade do kit foi analisada ao longo dos meses, atingindo até seis meses de integridade para todas as drogas. Para a avaliação da ação biológica as linhagens HL60 e Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 e mantidas em condições padrões. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de azul de Tripán, citometria de fluxo e agentes colorimétricos, sendo o cortante CellTiter 96 o mais eficiente para aplicação no modelo proposto. Os resultados demonstram confiabilidade quanto à estabilidade e reprodutibilidade dos efeitos citotóxicos das drogas testadas. A aplicação do teste *in vitro* em culturas primárias apresentaram importante correlação clínica quanto à resposta aos tratamentos administrados.

## **ABSTRACT**

Cancer is the second death cause in the world. Despite chemotherapy is an essential part of the treatment as well as in many times the only option of cure for the patients, disease progression and death are still resultants problems from the intrinsic and acquired drug resistance. In order to improve the response to treatments and individuals survival, several studies have evaluated different response systems to the drugs to determine the potential drug activity before their administration to the patients. In an attempt to solve manipulation problems of chemotherapeutics and degradation of samples, we developed ChemoBiogram that is the first in vitro chemoresistance assay for evaluation in a kit format. Thus, the general aim of this work is to validate the test for chemoresistance evaluation in acute leukemias, by confirming the integrity and biological action of the drugs on cell lines of ALL and AML, as well as in primary cultures from bone marrow samples. The drugs standards of interest were standardized by HPLC and the IC<sub>50</sub> was determined using HL60 and Jurkat cell lines. After standardization and determination of the doses the drugs were lyophilized in two different concentrations in the 96-well plate. The stability of the kit was analyzed over the months, reaching even nine month of integrity for all drugs. To assess biological action, the HL60 and Jurkat cell lines were cultured in RPMI 1640 and keep under standard conditions. The cell viability was evaluated by the trypan blue exclusion method, flow cytometry and colorimetric agent with the CellTiter 96 as an efficient standard for kit application. The results demonstrated reliability regarding stability and reproducibility of the cytotoxic effects of tested drugs. The application of the ChemoBiogram kit in primary cultures presented an important clinical correlation regarding the response of administered treatments.

## 1. INTRODUÇÃO

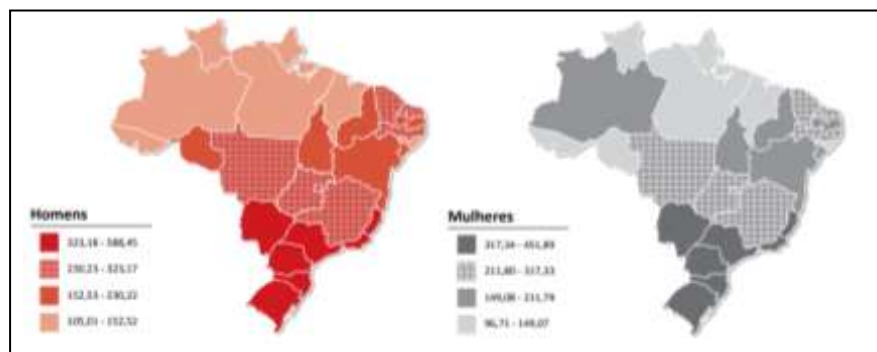
### 1.1 Câncer

O câncer caracteriza-se por um crescimento celular descontrolado, podendo ser gerado e mantido por diferentes regulações moleculares, genéticas, epigenéticas entre outras. Sua complexidade deve-se as interações celulares heterotípicas, formação do microambiente tumoral, desenvolvimento e expressão de características exclusivas ou não dos nichos tumorais. (LUO, 2009; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; INCA, 2016; HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

A estimativa para novos casos mundiais era de 14.1 milhões, levando mais de 8 milhões a óbito (TORRE *et al.*, 2015). O câncer é apontado como principal causa de morte em países desenvolvidos, tendo suas estimativas aumentadas significativamente também nos países em desenvolvimento durante a última década. As estimativas para o ano de 2035, exceto câncer de pele não melanoma, é de 35.057.603 casos com índices de mortalidade superior a 20 mil (GLOBOCAN, 2017).

No Brasil a estimativa para o biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer com prevalência total para o sexo masculino sendo maior a distribuição de novos casos nos estados sul e sudeste para homens e mulheres. A figura 1 mostra a distribuição de novos casos por 100 mil habitantes em todos os estados brasileiros (INCA, 2016).

**Figura 1: Representação das taxas de incidência total de câncer por 100mil habitantes para o ano de 2016.**



Fonte:INCA, 2016.

As opções de tratamento do câncer são cirurgia, quimioterapia, terapia-alvo, imunoterapia e radioterapia podendo os tratamentos serem isolados ou combinados com o objetivo de reduzir a toxicidade e preservar a qualidade de vida do paciente além do combate a doença (ALCOSER & RODGERS, 2003; SANTOS, 2012; INCA, 2016). Mesmo com os avanços na área de oncologia os índices de mortalidade são bastante altos, indicando falhas no tratamento.

## 1.2 Leucemias Agudas

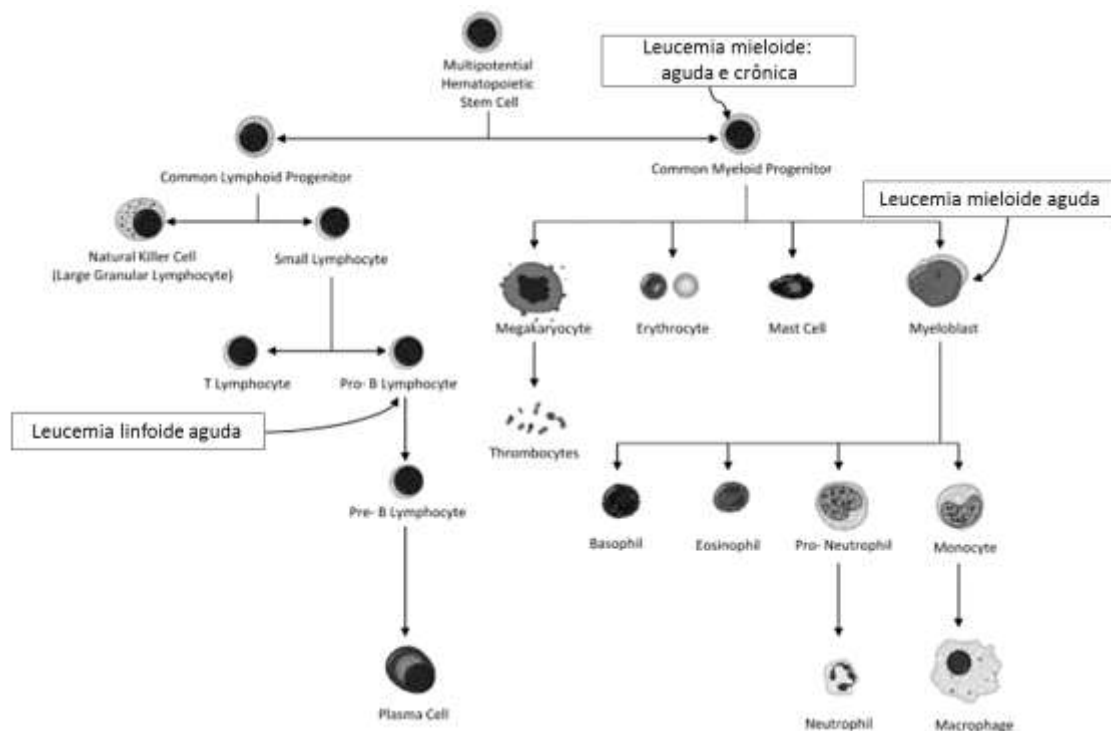
As leucemias correspondem a um conjunto de neoplasias malignas que afetam as células hematopoiéticas, com origem na medula óssea. Caracterizam-se pela proliferação desregulada de células precursoras sanguíneas de origem mieloide ou linfóide, podem ser agudas, quando possuem um baixo grau de diferenciação, ou crônicas, com alto grau de diferenciação (SMITH *et al.*, 2005; WIEMELS, 2012). A doença é reconhecida por ser muito heterogênea (ILYAS, 2015), que consiste em vários fenótipos clínicos.

Para o entendimento da origem desta neoplasia é necessário o conhecimento da formação normal do sangue. A medula óssea é um tecido esponjoso que preenche as cavidades dentro dos ossos. Todas as células sanguíneas são produzidas na medula óssea. O processo pelo qual as células sanguíneas são formadas é chamado de hematopoiese. As células-tronco encontradas na medula óssea são responsáveis pela diferenciação em

glóbulos vermelhos - responsáveis pelo transporte de oxigênio pelo corpo, plaquetas – responsáveis pela formação de coágulos - e os glóbulos brancos - fortes atuantes no combate às infecções (HOFFBRAND & MOSS, 2013; NCI, 2013; NCCN, 2017).

A figura 2 mostra as vias de diferenciação das células tronco no processo de hematopoiese diferenciando-se em células mieloides e linfoides. A via mieloide conduz os glóbulos vermelhos, plaquetas e granulócitos, enquanto a via linfóide conduz os diferentes tipos de glóbulos brancos do sangue.

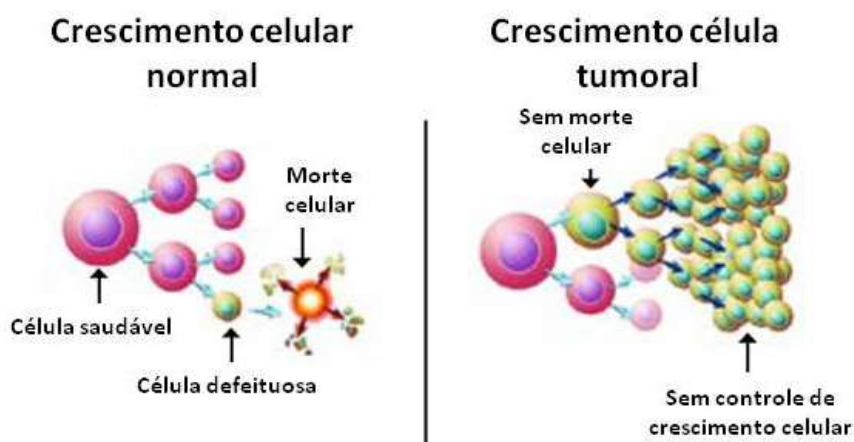
**Figura 2: Hematopoiese.** As células do sangue são derivadas de progenitores multipotenciais. Alterações na sua formação podem levar ao desenvolvimento de leucemias.



Fonte: adaptado de WIEMELS, 2012.

Assim como as demais neoplasias, alterações no ciclo celular e mecanismos moleculares levam as células normais a uma desregulação e crescimento descontrolado. A figura 3 ilustra a diferença entre células normais e leucêmicas, que diferentemente de células sanguíneas normais, não entram em processo de morte celular quando danificadas ou senescentes (NCCN, 2017).

**Figura 3: Crescimento celular normal versus crescimento de células tumorais**



Fonte:Adapatado de NCCN, 2017.

No ano de 2016, estimam-se 10 mil casos no Brasil e está entre as 15 neoplasias mais incidentes e com maior mortalidade em todo o mundo (INCA 2016; NCCN, 2017). As leucemias agudas representam 30% das neoplasias pediátricas, sendo as mais frequentes em indivíduos com menos de 15 anos (RIES *et al.*, 1998; EDEN, 2010; WIEMELS, 2012). Dentre estas a leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde a aproximadamente três quartos de todos os casos de leucemias em crianças, com frequência cinco vezes maior que a leucemia mieloide aguda (LMA) nessa população (BELSON *et al.*, 2007). Cerca de 85% dos casos de LLA são de linhagem de células B, enquanto os 15% restantes são de linhagem de células T (ZHAO *et al.*, 2013).

Em adultos as taxas de cura para leucemia mieloide aguda são de aproximadamente 30% com até 60 anos de idade e atingindo cerca de 10% acima desta faixa. Para leucemia linfóide aguda (LLA) as taxas de cura variam de 60 - 80%, entretanto cerca da metade destes pacientes sofrem recidiva, o que decai a taxa global de cura para aproximadamente 40% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; NCCN, 2017).

Desde a década de 60 há um aumento significativo quanto ao número de sobreviventes em cinco anos. Acredita-se que isto ocorra devido, principalmente, ao início da utilização de combinações quimioterápicas e novas

associações de terapias alvo. Além disso, foram introduzidas ao tratamento a quimioterapia intratecal (diretamente na medula óssea) e a radioterapia profilática no sistema nervoso central (SNC), visto que é muito comum ocorrerem recaídas da doença no SNC no período de remissão da medula óssea, ou ainda metástases testiculares entre outras menos frequentes.

A quimioterapia é o principal tratamento dos pacientes com esta neoplasia. A dose, tipos de medicamentos e a duração das aplicações variam de acordo com a idade, sexo, estágio da doença, origem das células malignas e outros fatores específicos das condições de cada paciente (ABRALE, 2015).

### 1.2.1 Tratamentos: Quimioterapia

A quimioterapia caracteriza-se pelo uso de agentes químicos para o tratamento de doenças, inicialmente descrito para uso em doenças infecciosas pelo químico Paul Ehrlich. Entretanto este termo ficou comumente aplicado ao tratamento oncológico. (DEVITA & CHU, 2008). Nos séculos passados os tratamentos realizados para o combate ao câncer eram prioritariamente cirúrgicos, seguidos da radioterapia. Com o passar do tempo, os pacientes que sobreviviam apresentavam metástases, e as taxas de sucesso destes tratamentos eram muito baixas, surgindo assim uma nova opção: a quimioterapia. Podendo ser associada aos demais tratamentos antes, depois e/ou concomitantemente. (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2017; DEVITA & CHU, 2008).

O início dos tratamentos farmacológicos para câncer iniciaram seus estudos e aplicações clínicas em neoplasias hematológicas, como as leucemias. O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Depois de observar que os soldados expostos a este gás desenvolveram hipoplasia medular surgiram estudos que recomendam o seu uso no tratamento dos linfomas malignos. Na década de 50, após a publicação dos estudos clínicos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, ocorreu um avanço crescente da quimioterapia citotóxica (DEVITA & CHU, 2008; MAXIMIANO, 2010).

Os esquemas terapêuticos atuais para estas neoplasias são geralmente constituídos por quatro componentes: indução, intensificação-consolidação, manutenção e prevenção da leucemia no sistema nervoso central (RADAELLI *et al.*, 2005; NCCN, 2017). Os protocolos diferenciam principalmente para tratamentos pediátricos e adultos. Os regimes pediátricos são mais intensos e complexos do que os dados aos adultos. As altas doses de quimioterapia que são pouco toleradas por adultos como, por exemplo, as drogas peg-asparaginase, vincristina, dexametasona e prednisona são altamente toleráveis para crianças e jovens adultos. Em contraste, os protocolos de adultos tendem a usar mais ciclofosfamida e antraciclinas, como doxorubicina e daunorrubicina que possuem características altamente mielossupressoras e podem prejudicar o desenvolvimento e recuperação medular em crianças. Nos protocolos pediátricos, o tratamento é administrado, em geral, por um longo período de tempo, recebendo terapia de manutenção por 3 anos enquanto adultos recebem por até 2 anos (NCCN, 2017).

**Tabela 1:** Quimioterápicos mais comuns para tratamentos de Leucemias Mieloide e Linfóide Agudas, segundo NCCN 2017.

LLA	LMA
Asparaginase	Citarabina
Clorafenib	Daunorrubicina
Ciclofosfamida	Cladribina
Citarabina	Idarrubicina
Daunorrubicina	fludarabina
Doxorrubicina	Midostaurin
Idarrubicina	Mitoxantrona
Ifosfamida	Decitabina
Mercaptopurina	Clorafenib
Metotrexato	Hidroxiureia
Vincristina	

Estudos indicam que cerca de 20% dos pacientes tratados apresentam resistência a algum medicamento administrado para tratamento da doença.



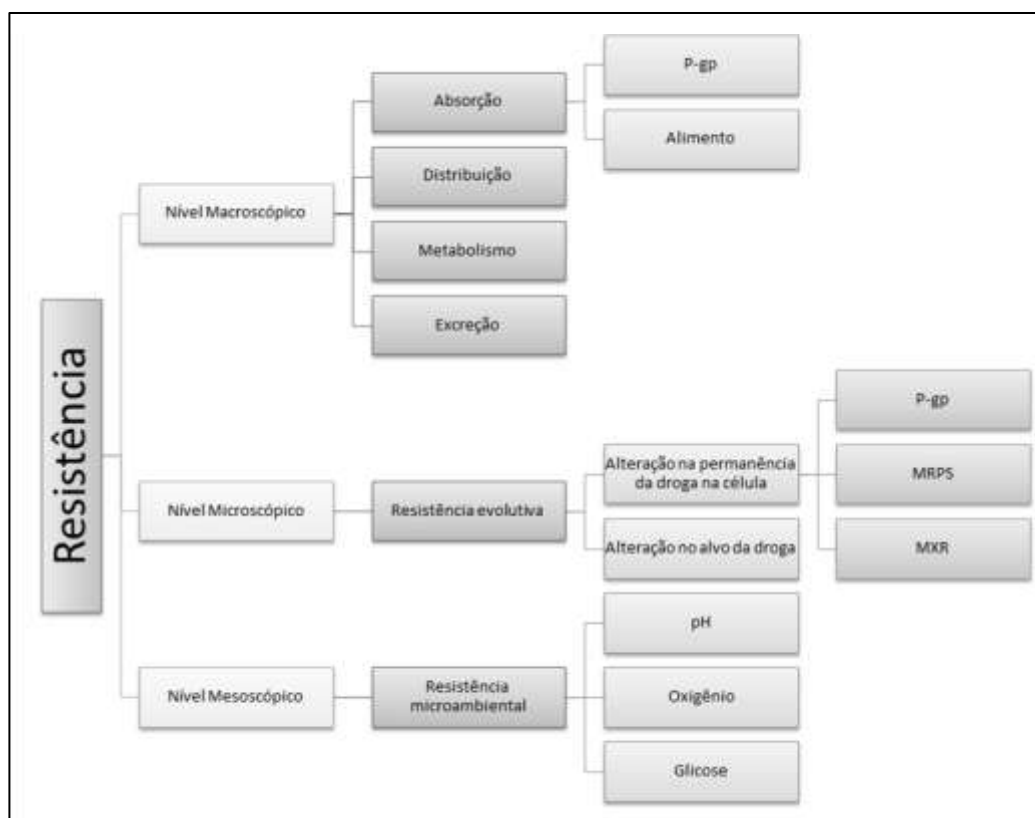
Segundo Millani (2013), o grande desafio para a eficiência dos tratamentos atuais é lidar com a resistência intrínseca e adquirida, resultando em recidivas e períodos longos de tratamento. A heterogeneidade da leucemia na resposta terapêutica e ao subsequente risco de recidivas indicam a necessidade de um delineamento do perfil de resposta individualmente para uma possível terapia personalizada e otimizada (MARSHALL *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2005).

### **1.3 Resistência tumoral**

A resistência a drogas é bastante conhecida e caracteriza-se pela tolerância às drogas administradas. Duas classificações básicas caracterizam a resistência tumoral à quimioterapia: intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca ocorre antes do tratamento devido a um perfil celular mais resistente. A resistência adquirida é aquela em que as células após períodos de exposição desenvolvem através de diferentes mecanismos que as tornam capazes de tolerar, muitas vezes, não somente a droga administrada como àquelas semelhantes estruturalmente ou funcionalmente. (HOUSMAN *et al.*, 2014; ZHENG, 2017).

Atualmente a resistência é considerada um fenômeno multifatorial que demanda atenção tanto ao paciente quanto à doença (ALFAROUK *et al.*, 2015) (Figura 4).

As células tumorais podem se tornar resistentes a uma droga específica ou a uma classe de drogas através de diversos mecanismos moleculares, tais como bombas transportadoras, oncogenes, genes supressores, alterações mitocondriais, mecanismos de reparo de DNA, autofagia, transição epitelio-mesenquimal e diversas proteínas envolvidas em modulações de ciclo celular e outros mecanismos celulares (ZHENG, 2017; LU, 2008; BRASSEUR, 2017). Sendo a quimiorresistência principal causa de recidiva da doença e metástases e continua sendo um dos principais obstáculos à terapia do câncer (MIWA *et al.*, 2014; BUSSMANN, 2016; ZHENG, 2017).



**Figura 4: Esquema representativo dos múltiplos fatores envolvidos na resistência quimioterápica** (adaptado de ALFAROUK *et al.*, 2015).

Apesar do conhecimento prévio dos diferentes mecanismos que levam a quimiorresistência, avaliações individuais não fazem parte da conduta clínica por serem métodos caros e que exigem profissionais habilitados para tal avaliação. Devido à especificidade de tecido ou célula inserida no microambiente tumoral é importante construir métodos de avaliação utilizando amostras do próprio paciente. Isto porque o ambiente no qual os tumores estão inseridos envolvem diversos tipos celulares e modificações importantes para sua manutenção, como por exemplo modificações de vascularização. Segundo Zheng (2017) estas técnicas devem ser aplicadas para que seja possível uma abordagem individualizada aumentando a eficácia terapêutica.

#### 1.4 Quimiorresistência e quimiossensibilidade

Testes capazes de avaliar respostas a drogas estão sendo testados a fim de determinar o real potencial terapêutico de agentes quimioterápicos antes da sua administração em pacientes com o intuito de melhorar a resposta aos tratamentos e a sobrevida dos indivíduos. Além da diminuição de

toxicidade e vantagens para o paciente a medicina personalizada traz vantagens econômicas importantes, evitando uso de medicamentos ineficazes (NCCN 2017; BUSSMANN, 2016).

Existem dois principais testes capazes de fazer uma predição de resposta aos tratamentos administrados. São eles os de quimiorresistência e quimiossensibilidade. Os testes de quimiorresistência destinam-se a identificar drogas às quais o tumor é resistente e possuem um valor preditivo negativo, enquanto que testes de quimiossensibilidade objetivam identificar as drogas às quais o tumor é mais sensível, ou seja, um valor preditivo positivo. Ambos os ensaios são realizados avaliando se o crescimento tumoral é inibido por um, ou mais, agentes farmacológicos.

Diversos ensaios *in vitro* avaliando resposta a drogas e a validação clínica foram desenvolvidos nos últimos vinte anos a fim de definir o melhor tratamento para cada paciente. Os ensaios *in vitro* de resposta a drogas determinam a atividade potencial de agentes quimioterápicos de um paciente antes do início do tratamento. A premissa é construir um perfil de resposta a drogas para cada paciente, em que as diferenças são baseadas na diversidade genética e no desenvolvimento de subclones de tumores com diferentes fenótipos (FRUEHAUF, 2002; VOLM & EFFERTH, 2015). Alguns estudos referentes ao valor preditivo de ensaios de resistência encontram-se resumidos na tabela 2. Diversos estudos demonstram benefícios de sobrevida quando comparados pacientes com resultados dos testes *in vitro* com perfil resistente e sensível. Os benefícios e comparações foram avaliados em tumores de ovário, colorretal, pâncreas, gástrico, melanoma, pulmão, leucemia entre outros (HERZOG *et al.*, 2010, ABE *et al.*, 1999, KABESHIMA *et al.*, 2002, MICHALSKI *et al.* 2008, DOERLER *et al.*, 2007, MOLLGARD *et al.*, 2000, KAWAMURA *et al.*, 1997).

**Tabela 2:** Valor preditivo de testes para avaliação de resistência a drogas (adaptada de VOLM & EFFERTH, 2015).

Teste	Tipo Tumor	Predição de acurácia
-------	------------	----------------------

Clonogênico	Ovário	99% resistência; 62% sensibilidade
Ensaio de resistência extrema a drogas	Ovário	100% resistência; 58% sensibilidade
Teste MTT	Mama	100% resistência; 76.7% sensibilidade
ATP luminescencia	Gástrico	95,7% resistência; 46.2% sensibilidade
Clonogênico	Melanoma	100% resistência; 38% sensibilidade
Citometria de Fluxo – integridade DNA	Glioma	81% resistência; 85% sensibilidade
Teste MTT	Leucemia aguda	77,8% resistência; 91,3% sensibilidade
Incorporação de H-timidina	Diversos	100%resistência; 46,2% sensibilidade

Ensaio clínicos demonstraram que testes de quimiorresistência tiveram mais de 90% de acurácia, enquanto testes de sensibilidade apenas 60% e a determinação de resposta a drogas foi independente do tipo de tumor, de teste ou droga utilizada nos testes *in vitro* (VOLM & EFFERTH, 2015). Bussmann (2016) apresenta superioridade em testes de quimiorresistência frente a quimiossensibilidade em câncer de cabeça e pescoço, sugerindo maior sobrevida global. Outro estudo relatou que o valor preditivo negativo para ensaios *in vitro* de resposta a drogas variou de 90% a 99%, enquanto o valor preditivo positivo foi inferior, variando entre 50% e 70% (WEISENTHAL & KERN,1991). Assim, estes testes são supostamente mais confiáveis para a identificação de drogas que são mais propensas a serem ineficazes (resistentes) em oposição à identificação de drogas que seriam eficazes (sensíveis).

Diversos estudos têm demonstrado resultados promissores com testes de avaliação de resposta a drogas em diferentes tumores. Metha e colaboradores (2001) demonstraram que o tempo médio de progressão de

doença em câncer de mama foi significativamente menor para pacientes com resistência extrema ou intermediária *in vitro*, comparados a pacientes com baixa resistência *in vitro*. Haroun, e colaboradores (2002) descreveram um perfil de resistência a drogas (extrema, intermediária ou baixa) com base em uma comparação estatística de um banco de dados de amostras de tumores cerebrais testados contra o mesmo painel de agentes quimioterápicos. Em câncer de ovário pacientes que utilizaram terapia dirigida por um teste de quimiorresistência tiveram uma taxa geral de resposta de 65% em comparação com 35% nas pacientes que foram tratadas empiricamente (LOIZZl *et al.*, 2003).

Atualmente existem serviços disponíveis para avaliação de quimiorresistência e quimiossensibilidade. Helomics, empresa norte-americana de medicina personalizada, desenvolveu um teste ChemoFx capaz de prever resposta para neoplasias ginecológicas, utilizando testes de luminescência e fluorescência para detecção e avaliação de resposta (HELOMICS, 2017). O Nagourney Cancer Institute também oferece um serviço para predição de resposta, atendendo a diversas neoplasias como leucemias, colorretal, tumores ginecológicos, cervical entre outros. Neste caso o serviço é capaz de indicar drogas que o paciente demonstra sensibilidade e resistência, incluídas ou não nos protocolos padrões para tratamento (NAGOURNEY CANCER INSTITUTE, 2017). Serviços como estes têm aumentado nos últimos anos, desenvolvendo métodos específicos de avaliação de resposta *in vitro*, combinados ou não com testes genéticos. Entretanto estes serviços contam com alguns complicadores, tais como: o envio da amostra até seus laboratórios de maneira íntegra e rápida o que gera alto custo para o paciente além de riscos de degradação. Além disso, o serviço necessita de drogas novas para cada paciente, encarecendo o serviço e aumentando os riscos àqueles que a manipulam.

A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (American Society of Clinical Oncology, ASCO) encontrou evidências suficientes para apoiar o uso de testes de resistência e sensibilidade a quimioterápicos na prática oncológica. Todavia, o grupo de trabalho da ASCO salientou que a realização dos testes pode envolver um trabalho de laboratório complexo, limitando uma ampla aplicação da tecnologia para a prática clínica de rotina. Dada a potencial

importância dos testes de quimiorresistência e quimiossensibilidade *in vitro*, a ASCO defende que ensaios clínicos avaliando essas tecnologias continuam a ser uma prioridade (SCHRAG *et al.*, 2004). Segundo diretrizes do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) de 2011 afirmam que testes de quimiossensibilidade e quimiorresistência podem ser utilizados para selecionar quimioterápicos em situações onde há várias opções de quimioterapias equivalentes disponíveis.

Devido aos inúmeros mecanismos de resistência, distintos e multifatoriais, há uma dificuldade em encontrar um único teste ótimo para avaliação, principalmente para quimiossensibilidade. Entretanto sugerem que testes *in vitro* podem auxiliar na detecção de resistência a drogas, e que esta última abordagem é mais atraente do ponto de vista prático. Isto porque pacientes diagnosticados *in vitro* como resistentes a determinadas drogas podem ser tratados com outras estratégias terapêuticas (ZHENG, 2017; VOLM & EFFERTH, 2015).

### **1.5 Kit ChemoBiogram®**

O kit desenvolvido pela empresa Ziel Biosciences Pesquisa e Desenvolvimento e Inovação, compreende uma placa de cultivo celular de 96 poços, contendo os principais quimioterápicos e drogas-alvo utilizados na clínica médica para o tratamento do câncer, sendo uma aplicação prática e segura de testes de quimiorresistência.

O kit possibilita prever potencial resposta de um tumor a diversos tratamentos, auxiliando o médico na escolha da terapia mais efetiva e menos tóxica para seu paciente individual, ou seja, atuando em medicina de precisão. As principais indicações do teste são ao diagnóstico, recidivas, tumores refratários, terapia primária (quando existem muitas opções equivalentes) e tumores raros (sem protocolos bem estabelecidos).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é avaliação de quimiorresistência em leucemias pediátricas agudas.

### **2.2 Objetivos específicos**

Estabelecer protocolo de análise de cada fármaco por UPLC, de acordo com padrão USP;

Definir as doses dos ativos capazes de induzir a morte das linhagens celulares de LMA e LLA em cultura;

Realizar processo de liofilização dos fármacos escolhidos para este estudo, tendo efeito comprovado sobre as células leucêmicas;

Determinar um método colorimétrico sensível e adequado para avaliação de viabilidade/morte celular;

Avaliar a estabilidade dos fármacos liofilizados ao longo dos meses.

### 3. CAPITULO I

#### ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Científico escrito em forma de *research article* para a revista *Journal of Biotechnology*

#### **Development and validation of methods for evaluating chemoresistance in acute leukemias**

*Camila Alves da Silva*<sup>1,2</sup>, *Natalia Mazini Ribeiro*<sup>3</sup>, *Mirela Severo Gil*<sup>1,2</sup>, *Kelly de Vargas Pinheiro*<sup>1,2</sup>, *Caroline Brunetto de Farias*<sup>1,2</sup>, *Rafael Roesler*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

<sup>3</sup>. Israeli Institute of Education and Research Albert Einstein, IIEPAE, of São Paulo, SP, 05652-900, Brazil.

\* Corresponding author: Rafael Roesler

Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350

Zip Code: RS 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 33597616

E-mail address: rafaelroesler@hcpa.edu.br



## **ABSTRACT**

Cancer is the second death cause in the world. Despite chemotherapy is an essential part of the treatment as well as in many times the only option of cure for the patients, disease progression and death are still resultants problems from the intrinsic and acquired drug resistance. In order to improve the response to treatments and individuals survival, several studies have evaluated different response systems to the drugs to determine the potential drug activity before their administration to the patients. In an attempt to solve manipulation problems of chemotherapeutics and degradation of samples, we developed ChemoBiogram that is the first in vitro chemoresistance assay for evaluation in a kit format. Thus, the general aim of this work is to validate the test for chemoresistance evaluation in acute leukemias, by confirming the integrity and biological action of the drugs on cell lines of ALL and AML, as well as in primary cultures from bone marrow samples. The drugs standards of interest were standardized by HPLC and the IC<sub>50</sub> was determined using HL60 and Jurkat cell lines. After standardization and determination of the doses the drugs were lyophilized in two different concentrations in the 96-well plate. The stability of the kit was analyzed over the months, reaching even nine month of integrity for all drugs. To assess biological action, the HL60 and Jurkat cell lines were cultured in RPMI 1640 and keep under standard conditions. The cell viability was evaluated by the trypan blue exclusion method, flow cytometry and colorimetric agent with the CellTiter 96 as an efficient standard for kit application. The results demonstrated reliability regarding stability and reproducibility of the cytotoxic effects of tested drugs.

## Introduction

Based on the hypothesis that each patient has a different drug response profile and that tumor heterogeneity itself can generate chemoresistant subpopulations [1, 2, 3] the search for tests that identify individual differences in response to antitumor treatments becomes a promising tool to the clinical setting. The mechanisms of resistance are numerous, varied and depend on multiple factors so patients diagnosed in vitro as drug resistant can be treated with other therapeutic strategies [7,11]. Several authors demonstrate promising results with drug response testing in different tumors. Results such as increasing the overall upper response rate for patients following chemoresistance testing and comparison of disease progression in patients who have several levels of resistance in vitro are some of the studies that corroborate this hypothesis [8, 9].

Tests for predicting response to oncological treatments can be through two types of evaluations: chemoresistance or chemosensitivity. Evidence indicates that the use of chemoresistance tests shows greater accuracy and superiority when compared to chemosensitivity tests [5,6,8,10]. The practical and safe application of chemoresistance testing, circumventing current restrictions on controlled handling of substances and transporting fresh tissue samples becomes a necessity. Therefore, the present test makes it possible to perform such tests in patients located in areas far from the appropriate laboratories, without wasting chemotherapeutic agents, sample degradation and transportation cost.

The ChemoBiogram<sup>®</sup> kit comprises a 96-well cell culture plate containing the main chemotherapeutics and target drugs used in the medical clinic for the treatment of acute leukemias, according to protocols indicated by the NCCN and at the doses previously established in the present work a prototype used for chemoresistance testing was designed. In the plate three doses are used for each drug, being an overdose that is necessary for evaluation of resistance in vitro. Thus, there is a great opportunity for an in vitro test that can be performed in a simple and effective way, minimizing contamination risks and allowing greater accessibility of patients to this technology. Therefore, the present study aims to validate the use of a chemoresistance test for hematological

malignancies such as acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL).

## **Materials and methods**

### *Cell lines and treatments*

Human cell lines (Jurkat and HL60) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) and cultivate based approaches according to standard ATCC procedures. Cells were grown in RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Carlsbad, CA), containing 0.1% Fungizone (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1% peniciline/streptomisine (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 10% fetal bovine serum (Invitrogen, São Paulo, Brazil), at 37 °C in a humidified incubator under 5% CO<sub>2</sub>.

### *Drugs and materials*

Citarabine (Aracytin), etoposide (Eunades), fludarabine (Fludalibbs), metotrexate (Fauldmetro), doxorubicin hydrochloride (Fauldoxo), daunorubicin hydrochloride (Daunoblastina), idarubicin hydrochloride (Zavedos), vincristine sulfeto (Faldivinciri), cyclophosphamide (Genuxal) and ifosfamide (Holoxane) all at a 1 mg mL<sup>-1</sup> concentration.

The colorimetric assays CellTiter Blue<sup>®</sup> (cat #G8081) and CellTiter 96<sup>®</sup> (cat #G3580) were used as directed by Promega Corporation, manufacturers of the products.

Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) in LC-UV-DAD (Hewlett-Packard<sup>®</sup> model HP 1290 Infinity). Water was purified by passage through a Milli-Q apparatus from Millipore (Bedford, MA, USA). For chromatographic separation, Kinetex<sup>®</sup> analytical column 2.6 µm C18 100 Å, LC Column 30 x 3 mm, recommended as a starting point for UPLC separations.

### *Lyophilization*

The freeze-drying for all drugs at concentration for use in liofilizator, HETO brand after freezing in ultrafreezer, Two were as conditions, first in the dose of

1mg ml<sup>-1</sup> for comparative with the UPLC standards and also in the doses determined as effective from the cellular viability assays in cell lines.

#### *UPLC-UV analyses of samples*

For the LC analysis, Hewlett-Packard® model HP 1290 Infinity system. This was equipped with a reversed phase Kinetex® analytical column C18 of 30 × 3mm, 2.6µm (Phenomenex, California). Acetonitrile and 50 methanol were used as the eluents, operating under gradient elution. The optimized program started with an isocratic with 20:80 H<sub>2</sub>O:ACN (v/v) 6 min, 50:50 H<sub>2</sub>O:MeOH (v/v) 6min, 20:80 H<sub>2</sub>O:MeOH depending of it drug's requirement and then a linear gradient to 90% of ACN in 1 min, which was maintained for 7.5 min ou MeOH for 6min. The conditions were established according to the standards (Table 1). For the UV analysis, an Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector was used. The analyte identification procedure was based on the retention time and UPLC analysis was performed using a Waters Acquity UPLC system (Waters Corporation).

#### *Cell viability assays*

##### Tripan blue exclusion method

Cells were seeded at a density of 1×10<sup>4</sup> cells/well (Jurkat and HL60) in 96-well plates (KASVI, Brazil). After 24h, they were treated with citarabine (0.24-24.4 µM), etoposide (0.1-6µM), fludarabine (2.5-50 µM), metotrexate (0.1-10µM), doxorubicin hydrochloride (25-500nM), daunorubicin hydrochloride (25-500nM), idarubicin hydrochloride (25-500nM), vincristine sulfeto (2.5-500nM), cyclophosphamide (1- 5mg/ml) and ifosfamide (100-2000µM) and incubate for 48h after experimental treatments and the cells were counted the trypan blue exclusion method in a hemocytometer [1,2].

##### Flow cytometry

Cells were seeded at a density of 5×10<sup>4</sup> cells/well (Jurkat and HL60) in 24-well plates (KASVI, Brazil). After 24h, they were treated with citarabine (0.24-24.4 µM), etoposide (0.1-6µM), fludarabine (2.5-50 µM), metotrexate (0.1-10µM), doxorubicin hydrochloride (25-500nM), daunorubicin hydrochloride (25-500nM),

idarubicin hydrochloride (25-500nM), vincristine sulfeto (2.5-500nM), cyclophosphamide (1- 5mg/ml) and ifosfamide (100-2000µM). The viability assay 48h after experimental treatments and cells were then resuspended in a solution of 1 µl of propidium iodide (PI, SigmaAldrich) per milliliter of PBS and incubated on ice for 15 min prior to analysis using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem—Life-Thermo, USA), and the Attune® software was used for analysis [2, 3].

### Colorimetric assay

Cells were seeded at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well (Jurkat and HL60) in 96-well plates (KASVI, Brazil). After 24h, they were treated with citarabine (0.24-24 µM). Viability was measured by two colorimetric assay, according to manufacturer's instructions. The first, Celltiter Blue® (Promega Corporation, EUA), use Resazurin Reduction reaction and the second, Celltiter 96® (Promega Corporation, EUA), use Tetrazolium Reduction reaction and the absorbance was read at 570 and 490, respectively. The times used for reading suggested by the manufacturer, being the times of 4 hours for CelltiterBlue® and 1.5 hours for Celltiter 96®.

### *Statistics*

All data are shown as means  $\pm$  standard errors of the mean (SEM) of 2–4 independent experiments. Differences between mean values were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett. P-values <0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### *Design teste ChemoBiogram®*

The plate contains eleven chemotherapeutics for treatment of acute leukemias in triplicate, three doses for each drug. As shown in figure 1.

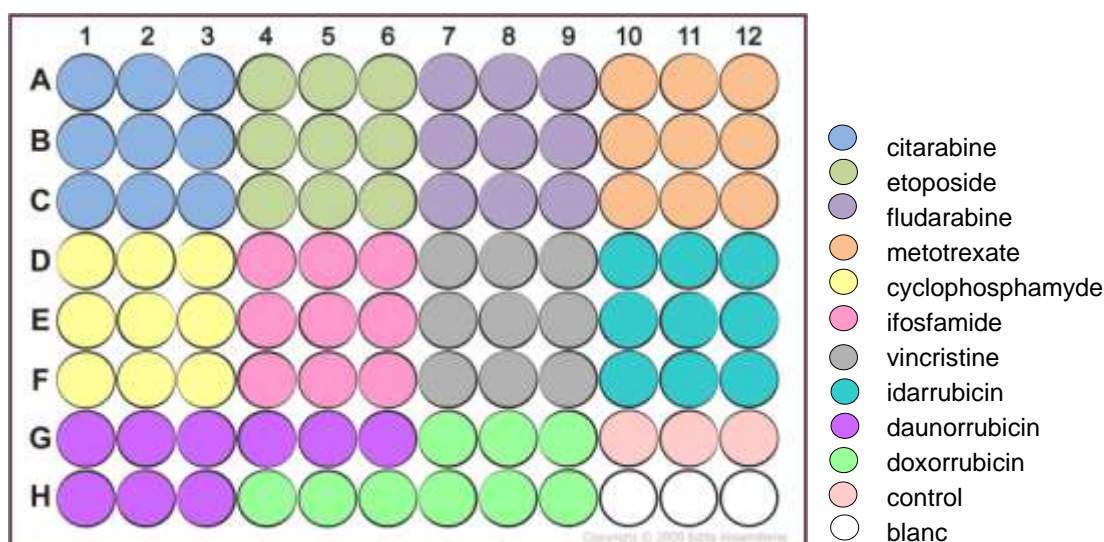


Figure 1: Design of the proposed prototype, containing ten cytotoxic drugs used in clinical practice for the treatment of patients with acute leukemias. The drugs were lyophilized at three different doses based on the dose curves performed in this study for initial chemoresistance tests on acute leukemia, HL60 and Jurkat cell lines.

### *Chomatographic separation*

Reversed-phase liquid chromatography was used, optimizing the separation conditions in accordance with tested drugs (Table 1) using Kinetex® analytical column 2.6  $\mu\text{m}$  C18 100 Å, LC Column 30 x 3 mm and different solvent mixtures were assayed as mobile phases in different proportions and considering different elution gradients at flow rates.

The concentrations of the analytes in the samples were determined from calibration curves defined by the linear regression method. The accuracy of the methods were verified in three different concentrations: LQC (low quality control), MQC (medium quality control) and HQC (high quality control), in triplicate. The drug stability freeze-dried varied over the evaluated months, remaining above 70% during the 6 months evaluated, as described in table 2. HPLC analyzes were performed up to 12 months after lyophilization, observing a significant decrease in the stability of some drugs. However, when evaluated its cytotoxic action on cell viability in HL60 and Jurkat cell lines, there was no decrease in its potential (data not shown).

**Table 1**

Conditions established with standard USP for drugs described in validation.

<b>Drug (standard USP)</b>	<b>Concentration (µg/mL)</b>	<b>Diluent</b>	<b>Injection (µL)</b>	<b>Flow-rate (mL/min)</b>	<b>Gradient elution</b>	<b>Absorbance (nm)</b>
Citarabine	10	H <sub>2</sub> O	10	0.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	254
Etoposide	10	H <sub>2</sub> O/MeOH (50:50)	10	0.3	80% MeOH	254
Fludarabine	10	H <sub>2</sub> O	10	0.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	254
Metotrexate	10	H <sub>2</sub> O/MeOH (50:50)	5	0.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (50:50)	307
Doxorubicin hydrochloride	50	H <sub>2</sub> O/ACN (20:80)	2	0.5	70% ACN	254
Daunorubicin Hydrochloride	50	H <sub>2</sub> O/ACN (20:80)	2	0.5	60% ACN	254
Vincristine sulfeto	10	H <sub>2</sub> O/MeOH (50:50)	10	0.3	80% MeOH	254
Cyclophosphamide	100	H <sub>2</sub> O	2	0.5	30% ACN	197
Ifosfamide	100	H <sub>2</sub> O	2	0.5	30% ACN	197

**Table 2.**

Evaluation of drug integrity immediately after lyophilization and 6 months of storage.

<b>Drug (freeze-dried)</b>	<b>Concentration (µg/mL)</b>	<b>Diluent</b>	<b>Injection (µL)</b>	<b>Flow-rate (mL/min)</b>	<b>Gradient elution</b>	<b>Absorbance (nm)</b>	<b>Integrity 1 day (%)</b>	<b>Integrity 6 months (%)</b>
Citarabine (Aracytin)	10	H <sub>2</sub> O	10	0.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	254	18	85
Etoposide (Eunades)	10	H <sub>2</sub> O/MeOH (50:50)	10	0.3	80% MeOH	254	70	70
Fludarabine (Fludalibbs)	10	H <sub>2</sub> O	10	0.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	254	82	82
Metotrexate (Fauldmetro)	10	H <sub>2</sub> O/MeOH (50:50)	5	0.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (50:50)	307	100	100
Doxorubicin hydrochloride (Fauldoxo)	50	H <sub>2</sub> O/ACN (20:80)	2	0.5	70% ACN	254	100	86
Daunorubicin Hydrochloride (Daunoblastina)	50	H <sub>2</sub> O/ACN (20:80)	2	0.5	60% ACN	254	100	100
Vincristine sulfeto (Faldivinciri)	10	H <sub>2</sub> O/MeOH (50:50)	10	0.3	80% MeOH	254	66	100
Cyclophosphamide (Genuxal)	100	H <sub>2</sub> O	2	0.5	30% ACN	197	15	80
Ifosfamide (Holoxane)	100	H <sub>2</sub> O	2	0.5	30% ACN	197	85	85



### *Evaluation of the inhibitory capacity of cytotoxic drugs on acute leukemia cell lines*

The cytotoxic activity of drugs was evaluated by trypan blue cell counting assay at 48h under standard growth conditions for Jurkat (Figure 2) and HL60 (Figure 3). Analysis with ANOVA indicated a reduction of cell viability at all doses tested for all drugs with response dose-dependent ( $P < 0.01$ ). Further analysis with Dunnett's tests comparing control and drug-treated cells showed that citarabine ( $0.24\mu\text{M}$ ) was ineffective in HL60 cells but significantly reduce cell viability in Jurkat cells ( $P < 0.01$ ). Treatment with intermediate and high doses reduced cell viability in all cell lines.

Cell viability was also evaluated by flow cytometry, replicating the experiments with the same doses and drugs in the cell lines. The cytotoxic activity was evaluated by flow cytometry with propidium iodide and evaluate at 48h under standard growth conditions for Jurkat (Figure 4) and HL60 (Figure 5). Analysis with ANOVA indicated a reduction of cell viability at all doses tested for all drugs with response dose-dependent ( $P < 0.01$ ). Further analysis with Dunnett's tests comparing control and drug-treated cells showed that cyclophosphamide ( $1\text{mg/ml}$ ) was ineffective in Jurkat cells but significantly reduce cell viability in HL60 cells ( $p < 0.05$ ), and daunorubicin ( $25\text{nM}$ ) was ineffective in both cell lines and dose  $50\text{nM}$  effective only in the Jurkat cell. Treatment with intermediate and high doses reduced cell viability in all cell lines.

This results suggest the reproducibility of the data in using different methods for evaluating cell viability. In this way allowing the use of different concentrations of cells and culture plates and amplifying the conditions to carry out the test.

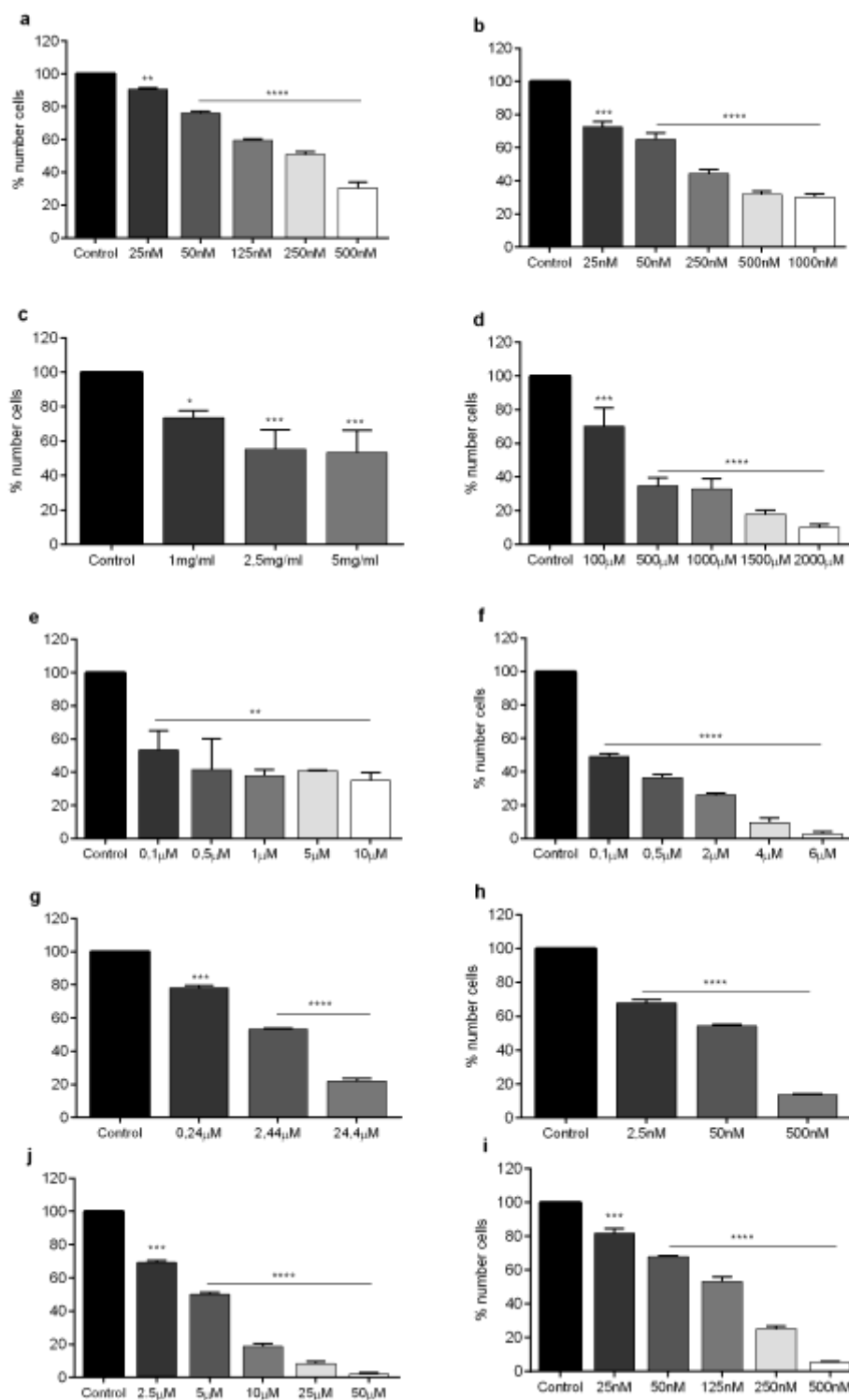


Figure 2: **Determination of dose curve for JURKAT cell line using trypan blue method.** Cells were cultured in standard conditions and seeded a  $1 \times 10^4$  cells/well in 96-well. Treatments with drugs a. daunorubicin b. doxorubicin c. cyclophosphamide d. ifosfamide e. metotrexate f. etoposide g. cytarabine h. vincristine i. idarubicin j. fludarabine to determine the dose curve. For all drugs, a dose-dependent profile was found. Cell viability was assessed by trypan blue cell counting 48h after treatment. (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc tests; n=2 independent experiments \*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ ; \*\*\*\*  $P < .0001$ ).

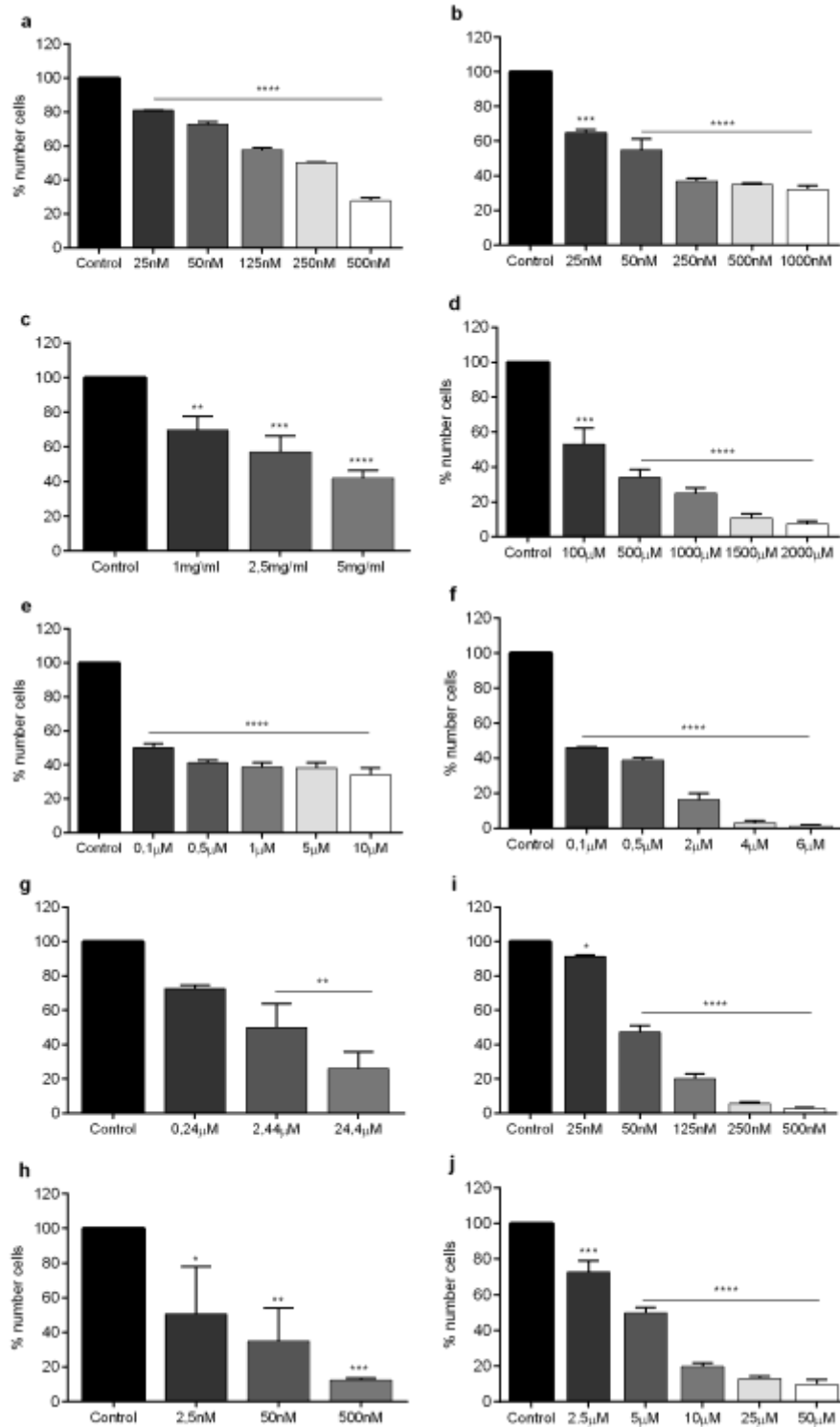


Figure 3: **Determination of dose curve for HL60 cell line using trypan blue method.** Cells were cultured in standard conditions and seeded a  $1 \times 10^4$  cells/well in 96-well. Treatments with drugs a. daunorubicin b. doxorubicin c. cyclophosphamide d. ifosfamide e. metotrexate f. etoposide g. cytarabine h. vincristine i. idarubicin j. fludarabine to determine the dose curve. For all drugs, a dose-dependent profile was found. Cell viability was assessed by trypan blue cell counting 48h after treatment. (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc tests; n=2 independent experiments \* P < .05; \*\* P<.01; \*\*\* P<.001; \*\*\*\* P<.0001).

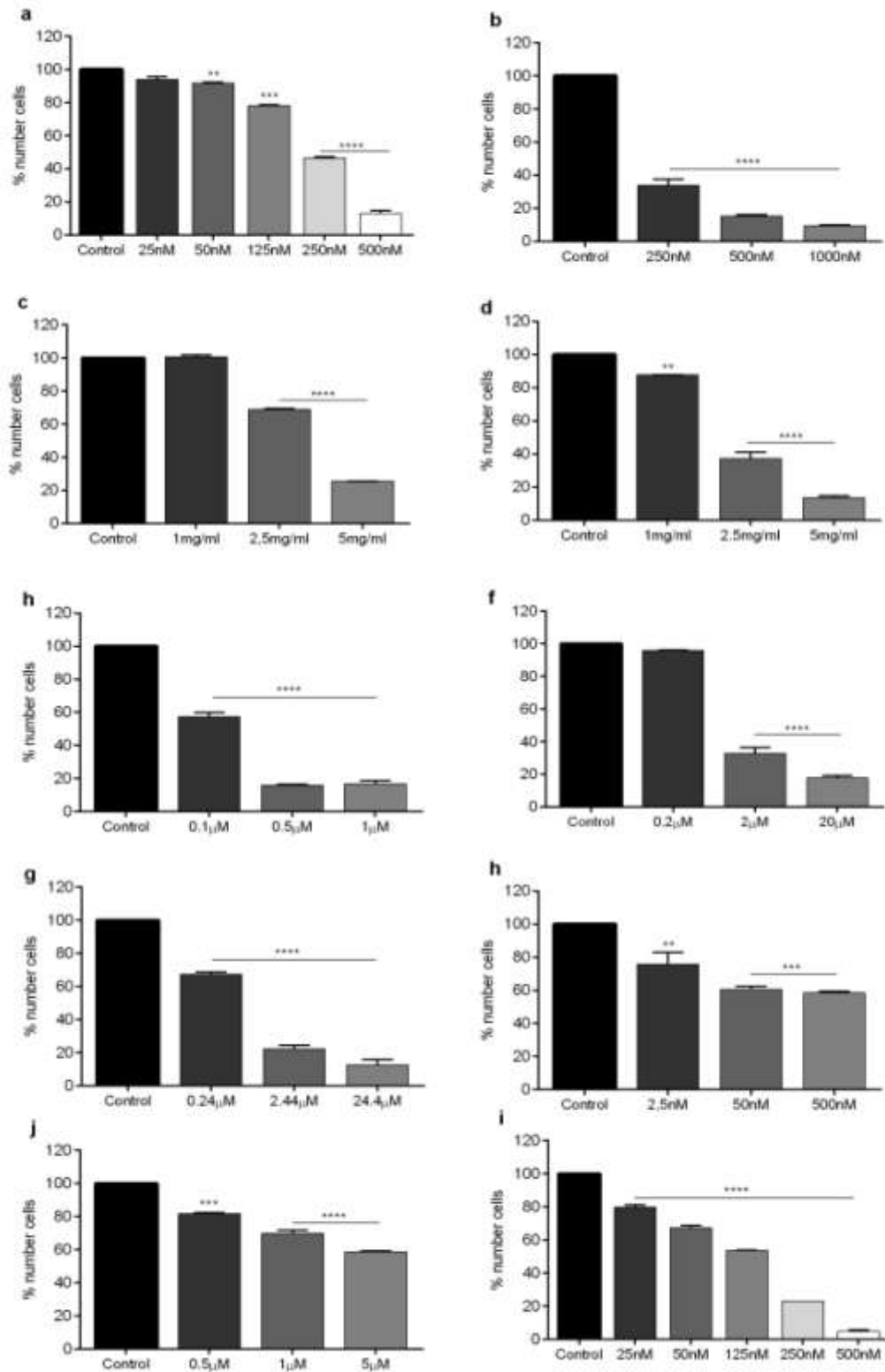


Figure 4: **Determination of dose curve for JURKAT cell line using flow cytometry.** JURKAT cells were cultured in standard conditions and seeded a  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well. Treatments with drugs a. daunorubicin b. doxorubicin c. ciclophosphamide d. ifosfamide e. metotrexate f. etoposide g. citarabine h. vincristine i. idarubicin j. fludarabine, to determine the dose curve. For all drugs, a dose-dependent profile was found. Cell viability was assessed by flow cytometry 48h after treatment, incubation with propidium iodide for 15min. (One-way ANOVA followed by

Dunnett's post hoc tests; n=3 independent experiments \* P < .05; \*\* P<.01; \*\*\* P<.001; \*\*\*\* P<.0001).

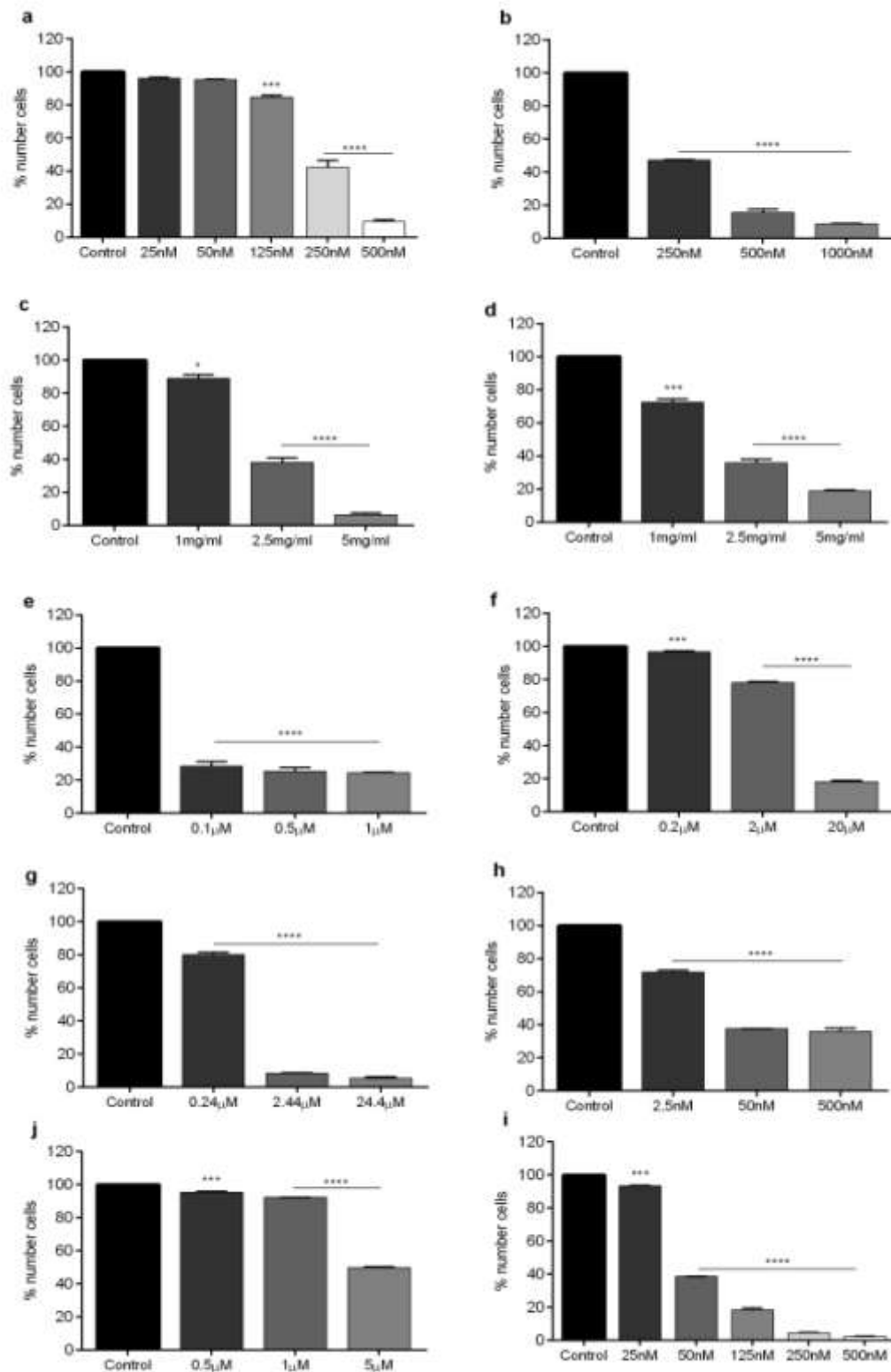


Figure 5: **Determination of dose curve for HL60 cell line using flow cytometry.** Cells were cultured in standard conditions and seeded a  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well. Treatments with drugs a. daunorubicin b. doxorubicin c.ciclophosphamide d. ifosfamide e.metotrexate f.etoposide

g.citarabine h. vincristine i.idarubicin j.fludarabine, to determine the dose curve. For all drugs, a dose-dependent profile was found. Cell viability was assessed by flow cytometry 48h after treatment, incubation with propidium iodide for 15min. (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc tests; n= 3 experiments independents \* P < .05; \*\* P<.01; \*\*\* P<.001; \*\*\*\* P<.0001)

### *The cytotoxic potential of the drugs is maintained after freeze-dried*

In order to increase stability the drugs were lyophilized. This process is responsible for removing the water molecules, decreasing the interactions and increasing the time of stock keeping the characteristics of the drug. For this, the newly opened drugs were reconstituted and placed in the 96-well plate which compose the test at the doses chosen for chemoresistance evaluation, as show in Figure 1.

In addition to assessing the integrity of lyophilized drugs, its cytotoxic potential is an important parameter. For this, treatments performed with newly reconstituted drugs and with drugs after lyophilized were compared. As shown in Figure 6, data with the drugs doxorubicin, citarabine and cyclophosphamide at three different doses did not present statistical differences comparing standard and freeze-dried. The experiments were repeated for all drugs in studies, demonstrating the reproducibility of these results.

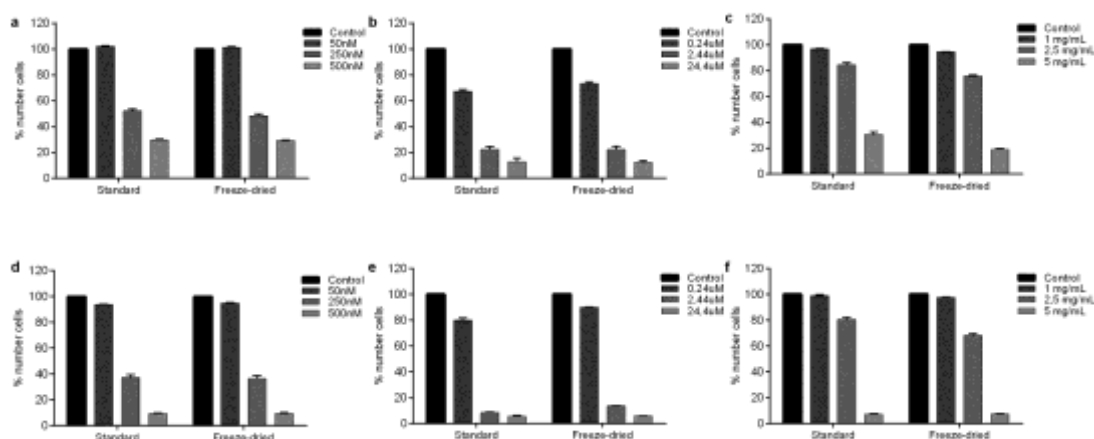


Figure 6: **Cytotoxic potential of the drugs is maintained after freeze-dried.** Cells were cultured in standard conditions and seeded a  $5 \times 10^4$  cells/well in 96-well. (a-c) Jurkat cells and (d-f) – HL60 cells; Treatments with drug doxorubicin (a, d), citarabine (b,e) and ciclophosphamide (c,f) to evaluate the cytotoxic action of lyophilized drugs compared to newly reconstituted drugs (standard). Cell viability was assessed by flow cytometry 48h after treatment, incubation with propidium iodide for 15min. (Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests; n= 3 experiments independents \* P < .05)

### *Use of colorimetric methods optimization of the cellular viability evaluation process*

The use of colorimetric methods as a measure for cell viability is quite fast and practical. Therefore, one of the objectives was to find a sensible method for both cell lines used in this work. The first Celltiter Blue<sup>®</sup> (Promega) was tested on Jurkat and HL60 cells with the drug cytarabine (Figure 7). In Jurkat cells (a) there was no significant difference between any of the doses tested as compared to the control, whereas in HL60 cells (b) there is a dose-dependent behavior among the different doses. Other drugs were used in doses already established in the two cell lines and the sensitivity to Jurkat cells was not observed in any of the experiments. The dye was also used for another acute lymphocytic leukemia (ALL) cell line and showed no sensitivity, suggesting a difference in CellTiter Blue<sup>®</sup> metabolism of ALL lymphocytes (data not shown). We also tested another colorimetric method, the CellTiter 96<sup>®</sup> contains a novel tetrazolium compound and quantity of formazan is directly proportional to the number of living cells in culture. Experiments already performed with CellTiter Blue<sup>®</sup> were repeated and demonstrated sensitivity for both cell lines. Jurkat cells showed a significant difference for all the doses tested when compared to the control, as well as the HL60 cells (Figure 8). When compared to the profile found in flow cytometry and tripan blue experiments this dye demonstrates statistical similarities.

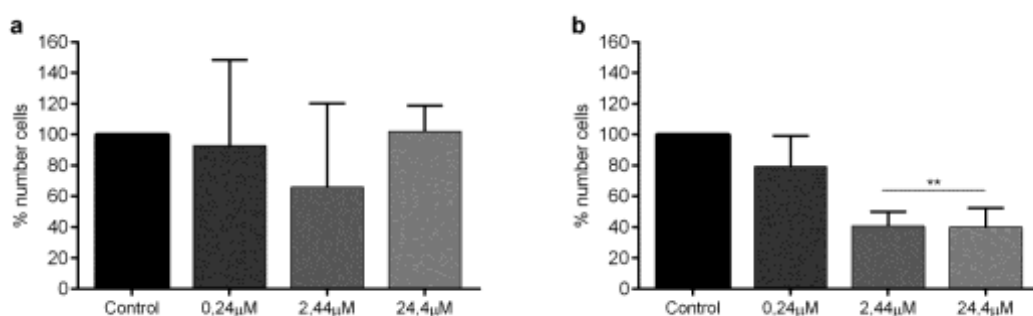


Figure 7: **Celltiter Blue<sup>®</sup> a possibility for evaluation of cellular viability.** Cells were cultured in standard conditions, seeded a  $1 \times 10^4$  cells/well in 96-well. Treatments with drug cytarabine (0.24 μM, 2.44 μM, 24.4 μM) to determine the efficiency of the colorimetric method (Celltiter Blue<sup>®</sup> – Promega) in Jurkat (a) and HL60 (b). Cell viability was assessed by Celltiter Blue<sup>®</sup> 48h after treatment, incubation with 20 μL for 4 hours and evaluates 573nm. (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc tests; n= 2 experiments independents \* P < .05; \*\* P<.01; \*\*\* P<.001; \*\*\*\* P<.0001).

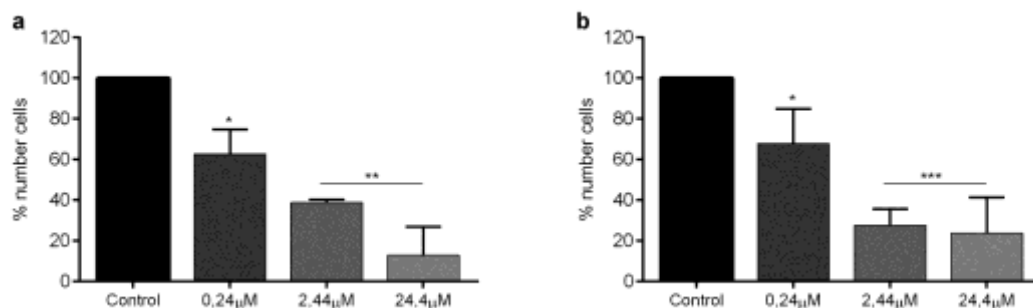


Figure 8: **Celltiter 96<sup>®</sup> direct measurement for evaluation of cell viability.** Cells were cultured in standard conditions, were seeded a  $5 \times 10^3$  cells/well in 96-well. Treatments with drug citarabine (0.24 $\mu$ M, 2.44 $\mu$ M, 24.4 $\mu$ M) to determine the efficiency of the colorimetric method (Celltiter 96<sup>®</sup> – Promega) in Jurkat (a) and HL60 (b). Cell viability was assessed by Celltiter 96<sup>®</sup> 48h after treatment, incubation with 5 $\mu$ L for 1.5 hour and evaluates 490nm. (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc tests; n= 2 experiments independents \* P < .05; \*\* P<.01; \*\*\* P<.001; \*\*\*\* P<.0001).

## DISCUSSION

The mechanisms for chemoresistance have not yet been clarified, because they are numerous and diverse. It becomes evident that cancer cells utilize multiple pathways to overcome the cytotoxic effect of drugs used during chemotherapy. Resistance tests should, therefore, recognize these pathways. Our studies attempted to expand the possibilities to unravel drug resistance. We validate ChemoBiogram that is the first in vitro chemoresistance assay for evaluation in a kit format. Reducing problems as only the manufacturer realizes and failures in the transport of fresh tissue samples.

Consistent data regarding the stability of the drugs in the kit were presented, reaching six months of stability keeping it under shelter of light and humidity. Some drugs have a much higher stability and integrity, however, as the proposal is to aggregate all of them into a single kit, we consider the longest time that all of them have remained intact. Some formulations were found to have reduced integrity, such as cytarabine and cyclophosphamide on the day they were opened and yet maintained their maintained cytotoxic capacity. We believe that these variations found on the first day may be constraints of technique and manipulation, since in the evaluations over the months they had their integrity established. At no time did the drugs that had drops in integrity



have their cytotoxic potential compromised when used in the cell lines of acute leukemias.

The concentrations chosen for the kit were determined following dose curves performed on the HL60 and Jurkat cell lines. Because it is a chemoresistance test the dose used for each compound should be much higher than its  $IC_{50}$  (half maximal inhibitory concentration). This is because administration of mean doses characterize chemosensitivity and of tumor cells detected *ex vivo* under artificial laboratory conditions does not necessarily comply with the specific situation of a patient. For example, effective levels of antineoplastic agents in tumors may not be achieved, if tumors are poorly vascularized or bioavailable, renal function, among others. Generating false-positive results. However high doses *in vitro* characterize chemoresistance evaluation. This is because the cells are more exposed to the treatments, receiving directly the action of the drugs and in case of absence of cell death the probability of the patient not responding to the treatment is higher than 90%, according to Volm and Effert.

For evaluation of cell viability, different methods they use in order to find a fast, sensitive and effective method for different cell types. Using for the standard flow cytometry and trypan blue exclusion method, two dyes from the company Promega were tested. Celtiter Blue presented sensitivity for the HL60 cell line (AML) however it is not showing good results with Jurkat (ALL). We performed experiments with other AML strains and ALL negative results for ALL were maintained (data not shown). CellTiter 96 showed sensitivity for both strains, and the dye was chosen for inclusion without kit.

The results obtained demonstrate reliability as to the stability and reproducibility of the cytotoxic effects of the drugs of interest as well as similarity between fresh and lyophilized preparations. In addition, the established colorimetric method for evaluating cell viability is sensitive and effective. In short our work helps in the path to understanding response profiles individuals as drugs enabling the development of more effective therapies in cancer treatment

## References

- [1] Heppner GH, Miller BE. Therapeutic implications of tumor heterogeneity. *Semin Oncol* 1989; 16:91-105; PMID:2652316
- [2] BHATIA, S, et.al. The challenges posed by cancer heterogeneity. *Nature Biotechnology*, [s.l.], v. 30, n. 7, p.604-610, 10 jul. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2294>
- [3] MIWA, S, et.al. Cell-cycle fate-monitoring distinguishes individual chemosensitive and chemoresistant cancer cells in drug-treated heterogeneous populations demonstrated by real-time Fucci imaging. *Cell Cycle*, [s.l.] v. 14, n. 4, p.621-629, 31 dez. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/15384101.2014.991604>.
- [4] Guidelines for National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2011. (<https://www.nccn.org/>)
- [5] Bussmann, L., et al.. Perspectives in chemosensitivity and chemoresistance assays and their implementation in head and neck cancer. *European Archives Of Oto-rhino-laryngology*, [s.l.], v. 273, n. 12, p.4073-4080, 11 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-015-3893-1>
- [6] Weisenthal LM, et.al. Predictive assays for drug and radiation resistance. In *Human Cancer in Primary Culture, a Handbook*, pp 103–147. 1991. Ed. JRW Masters. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- [7] Volm M & Efferth T. Prediction of cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. *Front. Oncol.* 5:282, 2015. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00282>
- [8] Loizzi V, et.al. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol.* 189 1301-7; 2003.
- [9] Mehta RS, et.al. Breast cancer survival and in vitro tumor response in the extreme drug resistance assay. *Breast Cancer Research and Treatment* 66 225–237; 2001.
- [10] Haroun RI, et.al. Extreme drug resistance in primary brain tumors: in vitro analysis of 64 resection specimens. *J Neurooncol.* 58 115-23; 2002.
- [11] Wang, C, et.al. Molecular Mechanisms of Chemoresistance in Oral Cancer. *Chinese Journal of Dental Research.* Page 25-33; 2016. doi:10.3290/j.cjdr.a35694.
- [12] HEINEN, TE, et.al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 23, p.34860-34880, 26 abr. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8992>
- [13] THOMAZ, A, et.al. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. *J. Mol Neurosci* (2015). <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0689-0>
- [14] DE ALMEIDA, VR, et.al. Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol* 2016. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0250-3>

- [15] ZHENG, Hua-chuan. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, [s.l.], p.59950-59964, 28 ago. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.19048>.
- [16] BUSSMANN, Lara et al. Perspectives in chemosensitivity and chemoresistance assays and their implementation in head and neck cancer. *European Archives Of Oto-rhino-laryngology*, [s.l.], v. 273, n. 12, p.4073-4080, 11 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-015-3893-1>.
- [17] NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, NCCN. Guidelines, 2017. Disponível em: <https://www.nccn.org/>
- [18] AMERICAN CANCER SOCIETY [homepage na internet]. Disponível em: <HTTP://www.cancer.org>.
- [19] ALFAROUK, K. O. et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int*, v. 15, p. 71, 2015. ISSN 1475-2867.
- [20] BRASSEUR K, GÉVRY N, ASSELIN E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget*. 2017; 8:4008–4042. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14021>.
- [21] Herzog TJ, Krivak TC, Fader AN, Coleman RL. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall survival in primary ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* (2010) 203(1):e1–6. doi:10.1016/j.ajog.2010.01.059
- [22] Blumenthal RD, Goldenberg DM. Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Mol Biotechnol* (2007) 35(2):185–97. doi:10.1007/BF02686104
- [23] Schrag D, Garewal HS, Burstein HJ, Samson DJ, Von Hoff DD, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology Technology assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol* (2004) 22(17):3631–8. doi:10.1200/JCO.2004.05.065
- [24] Burstein HJ, Mangu PB, Somerfield MR, Schrag D, Samson D, Holt L, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol* (2011) 29(24):3328–30. doi:10.1200/jco.2011.36.0354

## **4. CAPÍTULO II**

A seguir são apresentados alguns resultados adicionais do presente estudo que não foram anexados ao manuscrito, mas que corroboram com a validação do teste proposto.

### **4.1 INTRODUÇÃO**

Dentro das perspectivas do presente estudo, encontra-se a avaliação de quimiorresistência em pacientes com leucemias linfóide e mieloide agudas utilizando o ChemoBiogram. Desta forma torna-se possível acrescentar mais uma etapa na validação do método, ainda sem atingir o número estatístico de amostras.

A extensão das análises realizadas com linhagens celulares para amostras de pacientes demonstra também a aplicabilidade e sensibilidade do teste em um cenário clínico. Para esta etapa correlacionamos os achados do teste *in vitro* com as respostas do paciente aos tratamentos administrados, comparando uma possível quimiorresistência às drogas testadas com as falhas no tratamento.

### **4.2 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **4.2.1 Critérios de Inclusão de Pacientes**

Foram convidados a participar do estudo pacientes diagnosticados com neoplasias hematológicas com indicação de terapia sistêmica como parte de seu tratamento. Foram incluídos pacientes ao início do tratamento (antes da indução), e também no momento da recidiva, caso ocorra. Todos os sujeitos assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto ChemoBiogram está aprovado na Plataforma Brasil CAAE: 47506015.9.0000.5304 - Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ernesto Dornelles.

#### **4.2.2 Coleta de Sangue e Medula Óssea**

As coletas de sangue periférico e medula óssea dos pacientes foram realizadas apenas quando houve solicitação médica para avaliação de parâmetros clínicos do paciente, minimizando assim possíveis riscos e desconfortos. Estas avaliações acontecem, geralmente, ao diagnóstico e no período de indução e manutenção do tratamento.

Foram coletados 4 mL de medula óssea em tubos a vácuo com EDTA que foram processados no Laboratório de Câncer e Neurobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **4.2.3 Cultura Primária de Leucemias Mieloide e Linfoide Agudas**

Foi realizada a separação de linfócitos para todas as coletas de interesse no presente estudo. Para isso, em um tubo cônico de 15 mL, foram adicionados 4 mL de amostra a 3 mL de Ficoll-Paque, seguida de centrifugação a 1600 rpm durante 30 minutos. Após, o plasma da amostra foi coletado e a camada de células nucleadas transferida para outro tubo cônico, para sucessivas lavagens com 6 mL de PBS cada, em centrífuga por 10 minutos a 900 rpm e 670 rpm, respectivamente. Após, os linfócitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino, antibiótico e antifúngico. Após contagem de número de células em câmara de Neubauer com azul de Tripán, as células foram plaqueadas, tratadas e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

#### **4.2.4 Compostos Químicos**

A viabilidade celular foi avaliada após tratamento com as drogas que compõem o teste, são elas: citarabina (Aracytin), etoposídeo (Eunades), fludarabina (Fludalibbs), metotrexato (Fauldmetro), cloridrato de doxorubicina (Fauldoxo), cloridrato de daunorubicina (Daunoblastina), cloridrato de idarubicina (Zavedos), sulfato de vincristina (Faldivincri), ciclofosfamida (Genuxal) e ifosfamida (Holoxane).

As concentrações utilizadas foram àquelas determinadas por este trabalho nos experimentos com linhagens celulares de leucemia mieloide e linfoide agudas.

#### **4.2.5 Métodos de Avaliação de Viabilidade e Celular**

Após o tratamento, a avaliação de viabilidade pelo método de exclusão por Azul de Tripán, conforme descrito no manuscrito deste trabalho. Brevemente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo os tratamentos propostos pelo teste, em triplicatas por 48 h. Após esse período, uma alíquota de 10 µL de cada amostra era homogeneizada manualmente a uma alíquota de 10 µL de TripánBlue 0,4 % (Vetec, Brasil) e realizada a contagem celular por microscopia óptica em hemocitômetro. As células mortas ou com danos na membrana celular são permeáveis ao corante, e desta forma a viabilidade celular é a razão entre as células não coradas (vivas) e coradas (mortas).

#### **4.2.6 Avaliação de resultados**

Este trabalho utilizou amostras de conveniência. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), considerando controle 100 %. As comparações foram realizadas da maneira caso controle os resultados comparados entre os tratamentos realizados. Para determinação do nível de resistência foi utilizado um valor padrão para cada paciente de acordo com a porcentagem de morte celular na dose correspondente a quimiorresistência. Sendo sobrevivência celular superior a 60% correspondente a alta resistência, entre 40-60% resistência intermediária e valores abaixo de 40% correspondente a baixa resistência.

### **4.3 RESULTADOS PRELIMINARES**

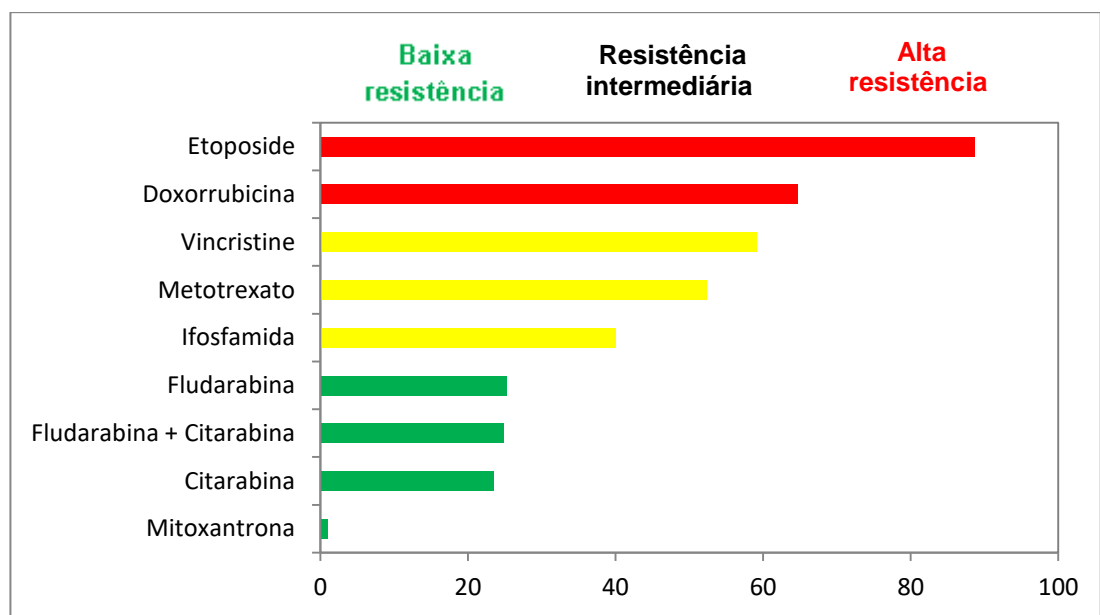
Os dados abaixo são uma apresentação em porcentagem das contagens dos pacientes, sendo o controle sempre considerado como sendo 100% de viabilidade celular e os outros tratamentos com valores em relação a ele. O número de casos mostrados a seguir, é inferior ao cálculo amostral devido às dificuldades encontradas para realização dos cultivos, manutenção das células, obtenção de amostras com células viáveis e correlação com os achados clínicos dos pacientes.

Os dados serão apresentados considerando cada paciente um caso isolado e correlacionando seu perfil de resposta *in vitro* com sua resposta clínica.

#### 4.3.1 Caso 1

Paciente do sexo masculino, PLB, 13 anos com leucemia mieloide aguda (LMA). No momento da coleta o paciente estava no início do tratamento da recidiva e cerca de 90% de blastos leucêmicos. Como primeira linha de tratamento o paciente recebeu as drogas doxorrubicina, etoposideo, vincristina, fludarabina e citarabina, dentre outras. Após a recidiva a primeira escolha do oncologista responsável sugeria a administração de baixas doses de fludarabina combinada com citarabina.

A resistência demonstrada na figura abaixo corrobora com os dados clínicos preliminares, nos quais o paciente não obteve boa resposta para as drogas descritas acima e as mesmas apresentam alta resistência e intermediária segundo o teste. Apesar das drogas fludarabina e citarabina apresentarem baixa resistência sozinhas e em combinação não foi possível conter a doença. As indicações de baixas doses combinadas, muitas vezes, podem desenvolver resistência por permitirem o desenvolvimento de mecanismos de resistência pois não combatem as células malignas e seu nicho de forma ágil, mas podem ser mais toleradas em longos períodos atuando na manutenção e combate da doença.

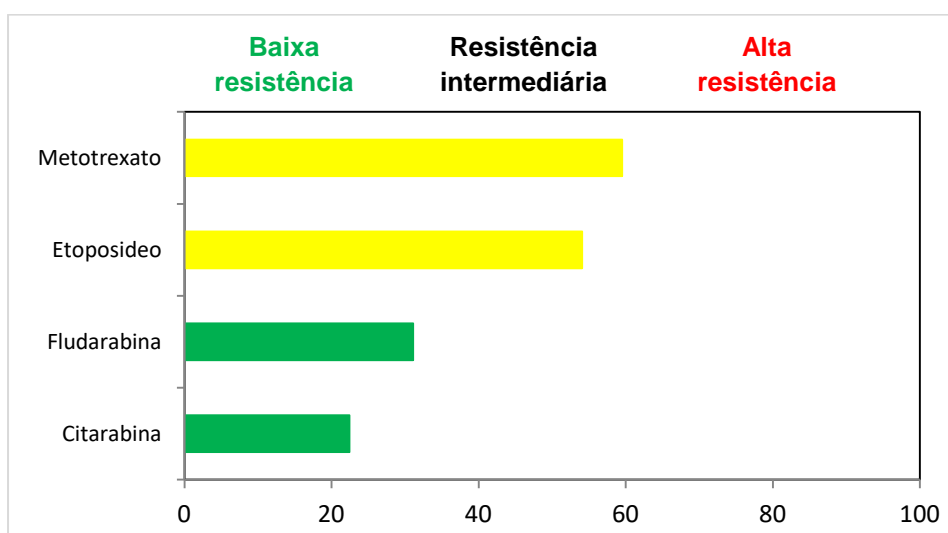


**Figura 5:** Avaliação de quimiorresistência do paciente PLB, em amostra de sangue periférico no momento da recidiva.

O paciente não respondeu ao tratamento combinado de fludarabina e citarabina em baixas doses, o que levou o médico a escolha de um tratamento experimental com ivermectina e obteve a remissão da doença. Os indicativos de baixa resistência, pelo que observamos com alguns pacientes não são necessariamente indicativos de sucesso no tratamento, entretanto as drogas altamente resistentes de fato não apresentam resultados clínicos positivos.

#### 4.3.2 Caso 2

Paciente do sexo masculino, GOK, 12 anos com leucemia mieloide aguda (LMA). No momento da primeira coleta obtida o paciente estava no dia zero da primeira indução, ou seja, logo após o diagnóstico e sem qualquer tratamento quimioterápico, e cerca de 86% de blastos leucêmicos. Conforme demonstrado na figura abaixo, o paciente não demonstrava alta resistência às drogas testadas, o que corrobora com dados de redução de blastos pós-tratamento inicial. Por ser uma análise ao diagnóstico a resistência avaliada está relacionada a uma resistência intrínseca do paciente, pouco descrita em pacientes pediátricos.

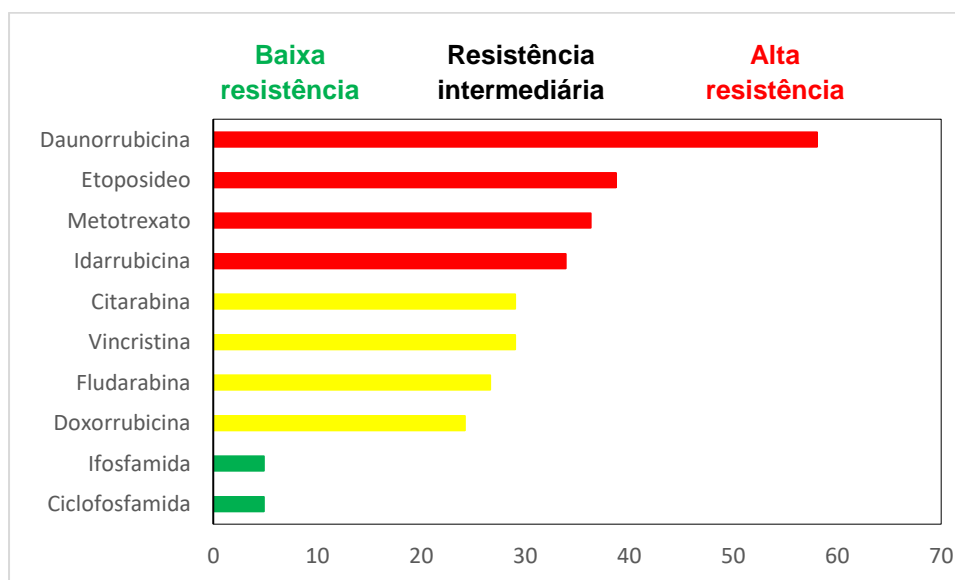


**Figura 6:** Avaliação de quimiorresistência do paciente GOK, em amostra de medula óssea no momento do diagnóstico



A segunda coleta refere-se ao momento de tratamento dois meses após o diagnóstico em que o paciente apresentava cerca de 70% de blastos leucêmicos. Até este momento os tratamentos administrados foram etoposídeo, idarrubicina, fludarabina e citarabina.

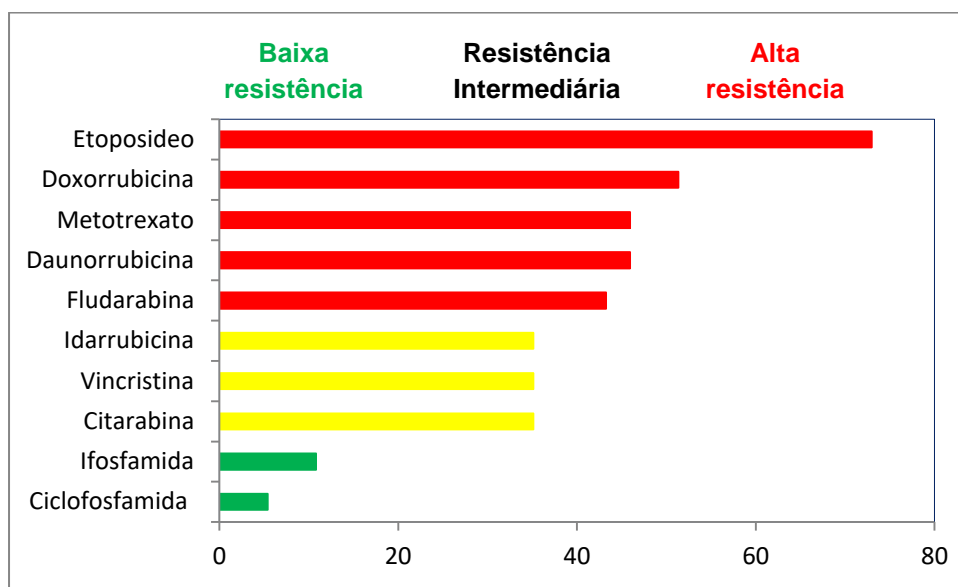
O perfil de resposta avaliado no teste mostrou-se bastante diferente, apresentando alta resistência para diversas drogas, incluindo aquelas administradas ao longo do tratamento. Drogas como metotrexato e etoposídeo que apresentavam uma resistência intermediária tiveram uma evolução apresentando alta resistência após tratamento, assim como drogas que apresentavam baixa resistência no primeiro momento evoluíram para uma resistência intermediária.



**Figura 7:** Avaliação de quimiorresistência do paciente GOK, em amostra de medula óssea após tratamento de indução.

O caso em estudo não teve doença residual negativa em nenhum momento do tratamento, chegando até 2% de blastos leucêmicos em determinados momentos, mas nunca conseguindo manter a doença controlada. O terceiro momento refere-se à coleta realizada após 5 meses do diagnóstico em que o paciente seguia com o protocolo de tratamento da coleta anterior mais a droga ciclofosfamida. O teste demonstrou um perfil ainda mais resistente, no qual drogas antes referidas como resistência intermediária passaram a resistência alta, como a fludarabina. A nova droga inserida no

protocolo de tratamento, ciclofosfamida, apresentou baixa resistência. Entretanto as drogas que apresentam baixa resistência não equivalem a resposta clínica, tendo em vista que o ChemoBiogram avalia resistência, ou seja um valor preditivo negativo.

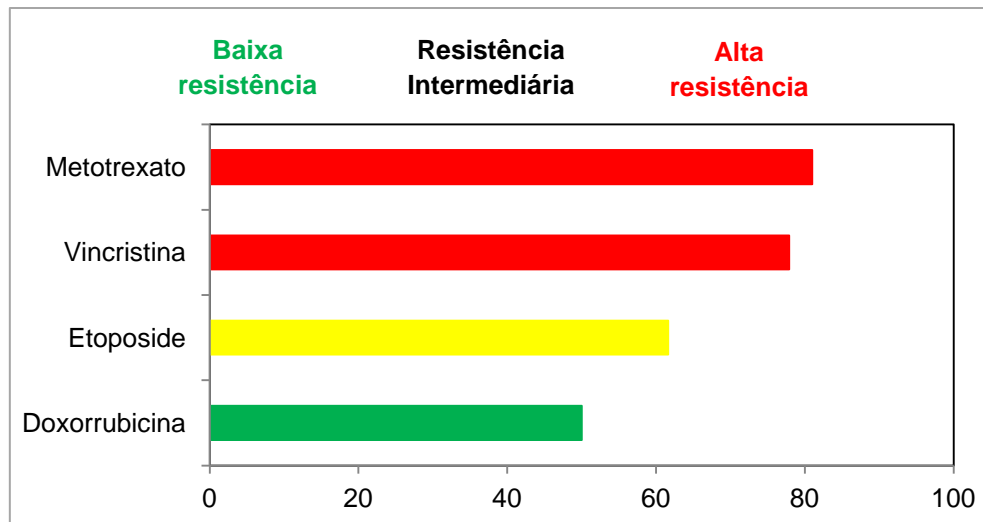


**Figura 8:** Avaliação de quimiorresistência do paciente GOK, em amostra de medula óssea após 5 meses de tratamento.

O acompanhamento realizado ao longo dos cinco meses de tratamento demonstra que o perfil de resistência é bastante alterado conforme administração de diferentes drogas, sugerindo que a resistência adquirida é uma possível causa para a falha no tratamento. O paciente em estudo não respondeu efetivamente a nenhum protocolo administrado e veio a óbito.

#### 4.3.3 Caso 3

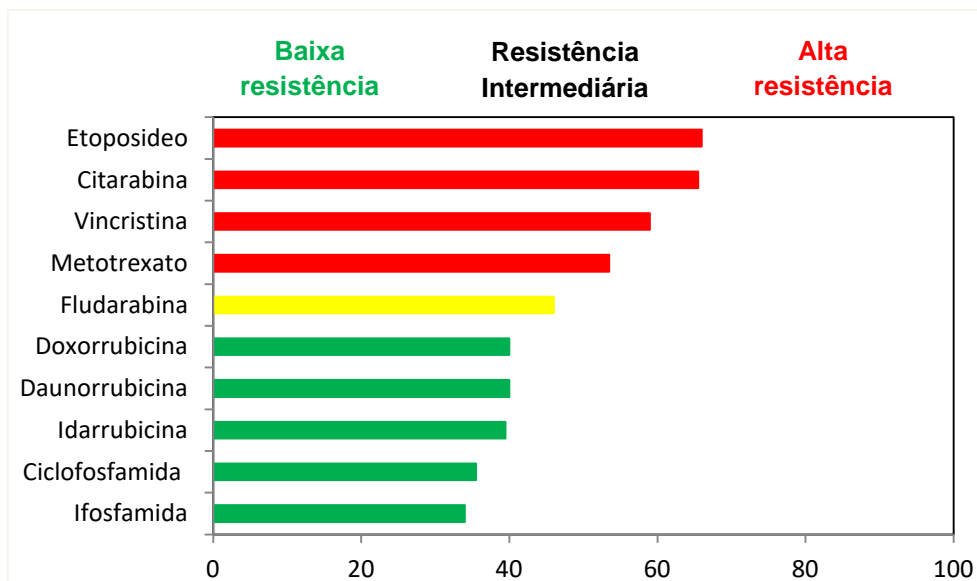
Paciente do sexo feminino, KRB, 13 anos com leucemia linfóide aguda (LLA). No momento da primeira coleta obtida o paciente estava no dia zero da primeira indução, ou seja, logo após o diagnóstico e sem qualquer tratamento quimioterápico. Em um primeiro momento a paciente já apresentava alta resistência aos fármacos metotrexato e vincristina e uma resistência intermediária a etoposideo, fenômeno pouco observado em crianças.



**Figura 9:** Avaliação de quimiorresistência do paciente KRB, em amostra de medula óssea no momento do diagnóstico.

Após os ciclos de indução, uma segunda coleta foi testada mesmo apresentando doença residual negativa. A paciente recebeu até o momento do teste as drogas citarabina, vincristina, metotrexato, daunorrubicina e ciclofosfamida. O resultado do teste demonstrou alta resistência aos fármacos daunorrubicina, metotrexato, vincristina, administradas ao longo da indução. Drogas como daunorrubicina e ciclofosfamida apresentaram baixa resistência e também foram administradas.

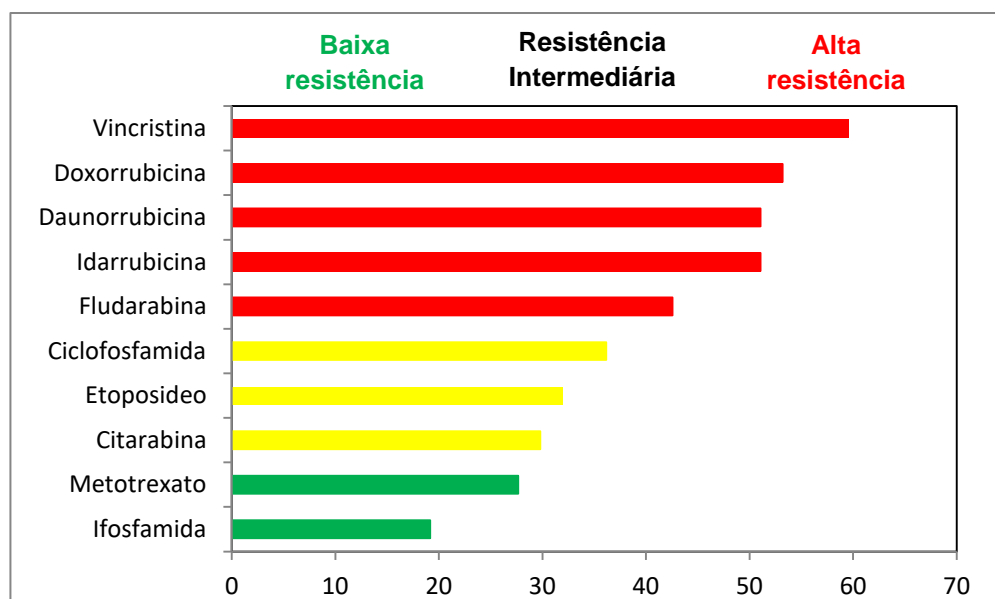
De maneira geral o teste indicou possíveis drogas para uso que de fato auxiliaram na remissão da doença e apesar da resistência alta a drogas administradas a paciente entrou em remissão da doença e mantém o tratamento. Além de observar-se que o perfil de resistência é alterado pelo tratamento administrado.



**Figura 10:** Avaliação de quimiorresistência do paciente KRB, em amostra de medula óssea após tratamento de indução.

#### 4.3.4 Caso 4

Paciente do sexo masculino, WICCS, 13 anos com leucemia mieloide aguda (LMA). No momento da coleta o paciente estava em uma segunda recidiva e cerca de 90% de blastos leucêmicos. O paciente já havia recebido, ao longo dos dois tratamentos prévios as drogas idarrubicina, etoposideo, fludarabina e citarabina, dentre outras sem obtenção de resultados positivos e remissão da doença. O teste demonstrou resistência alta e intermediária para todas as drogas administradas no paciente até o momento. O tratamento iniciado logo após o momento da coleta era a combinação de fludarabina e citarabina em baixas doses, conduta frequentemente escolhida na clínica e indicadas como alta e intermediária resistência pelo teste. As drogas indicadas como pouco resistentes não fazem parte dos protocolos para tratamento de LMA, levantando ainda a hipótese de que o tratamento personalizado fora de protocolos estabelecidos pode ser uma solução na busca da remissão completa. O paciente manteve ausência de resposta ao tratamento e veio a óbito dias após coleta.



**Figura 11:** Avaliação de quimiorresistência do paciente WICCS, em amostra de sangue periférico no momento da segunda recidiva.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho objetivou avaliação de quimiorresistência em leucemias pediátricas agudas utilizando como ferramenta o kit ChemoBiogram®, as validações deste método foram realizadas através da confirmação da integridade de drogas após a liofilização e ação biológica destas sobre células leucêmicas. A escolha da neoplasia deu-se pela maior facilidade para obtenção de amostras e acompanhamento de pacientes a longo prazo. O kit utilizado apresenta características diferenciadas com grande potencial de mercado, além de demonstrar uma importante ferramenta para pesquisa. Segundo diretrizes do NCCN aplicação de testes de quimiorresistência e quimiossensibilidade no cenário clínico encontra alguns obstáculos, como restrições à realização dos testes apenas pelo fabricante que tem infraestrutura adequada para lidar com a manipulação controlada de substâncias como quimioterápicos e transporte de amostras de tecido a fresco. Muitas vezes estas amostras estão em pequena quantidade e necessitam ser rápida e cautelosamente transportadas para que não sofram degradação. Este fator inviabiliza a realização dos testes em pacientes localizados em áreas distantes dos laboratórios apropriados a realizar os testes. Problemas estes que podem ser solucionados com o uso do kit utilizado do estudo.

Foram apresentados dados consistentes para todos os objetivos propostos estabelecendo a cultura das linhagens celulares, definindo as doses de fármacos a serem utilizados, liofilização dos fármacos, estabelecimento de protocolos de análise por HPLC para avaliação da estabilidade e a quimiorresistência das drogas. Os resultados apresentados demonstram a estabilidade dos fármacos utilizados por um período de até 6 meses em armazenamento a temperatura ambiente, sem necessidade de manipulação dos quimioterápicos por aqueles que utilizam o teste.

Nos testes com linhagens celulares *in vitro* as avaliações apresentadas mostraram confiabilidade quanto a estabilidade e reprodutibilidade dos efeitos citotóxicos dos agentes antineoplásicos, similaridade entre as preparações

frescas e liofilizadas e estabelecimento de método colorimétrico para avaliação de viabilidade celular.

Ainda, os testes iniciados com amostras biológicas de pacientes acometidos por leucemias agudas mostraram-se promissores. A proposta de avaliação de quimiorresistência não é predição direta de resposta e sim de ausência dela, indicando pacientes poucos responsivos *in vitro* tem também respostas negativas na clínica. Sabendo dos muitos mecanismos de resistência e resposta aos diferentes fármacos este não é um teste de resposta definitiva, tendo em vista que um dos casos observados apesar de apresentar alta resistência, aparentemente intrínseca, conseguiu atingir a remissão completa da doença.

Em suma nossos resultados indicam o caminho para compreensão de perfis de resposta individuais possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficazes no tratamento oncológico.

## **6. PERSPECTIVAS**

- Ampliar o número de amostras de leucemia mieloide e linfóide aguda;
- Desenvolver uma plataforma para uso em tumores sólidos;



## REFERÊNCIAS

DEVITA VT Jr e CHU E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*,68(21):8643-53,2008.

MIWA, Shinji et al. Cell-cycle fate-monitoring distinguishes individual chemosensitive and chemoresistant cancer cells in drug-treated heterogeneous populations demonstrated by real-time Fucci imaging. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.621-629, 31 dez. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/15384101.2014.991604>.

ZHENG, Hua-chuan. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, [s.l.], p.59950-59964, 28 ago. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.19048>.

BUSSMANN, Lara et al. Perspectives in chemosensitivity and chemoresistance assays and their implementation in head and neck cancer. **European Archives Of Oto-rhino-laryngology**, [s.l.], v. 273, n. 12, p.4073-4080, 11 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-015-3893-1>.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Chemotherapy and you: Support for people with cancer. NIH publication n°11-7156, 2011.

Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**. 2007 115(1):138-45.

Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, editors. **SEER Cancer Statistics Review**, 1973-1995, 1998.

LUO J, SOLIMINI NL, ELLEDGE SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5):823-37,2009.

HAROUN RI, CLATTERBUCK RE, GIBBONS MC, BURGER PC, PARKER R, FRUEHAUF JP, BREM H. Extreme drug resistance in primary brain tumors: in vitro analysis of 64 resection specimens. *J Neurooncol*. **58** 115-23, 2002.

LOIZZI V, CHAN JK, OSANN K, CAPPUCCINI F, DISAIA PJ, BERMAN ML. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol*. **189** 1301-7, 2003.

HOUSMANN G, BYLER S, HEERBOTH S, LAPINSKA K, LONGACRE M, SNYDER N. Drug resistance in cancer:an overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6:1769-92.

IARC, International Agency for Research on Cancer [homepage na internet]. Disponível em: <https://www.iarc.fr/>. Acesso em 06 de outubro de 2017.

MEHTA RS, BORNSTEIN R, YU I-R, PARKER RJ, MCCLAREN CE, NGUYEN KP & FRUEHAUF JP. Breast cancer survival and *in vitro* tumor response in the extreme drug resistance assay. *Breast Cancer Research and Treatment* **66** 225–237, 2001.

VOLM M & EFFERTH T. Prediction of cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. *Front. Oncol.* **5**:282, 2015.

SMITH MT, MCHALE CM, ET AL. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 206: 237 – 245.

WIEMELS J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-Biological Interactions*. 196: 59–67, 2012.

WEISENTHAL LM. Predictive assays for drug and radiation resistance. In *Human Cancer in Primary Culture, a Handbook*, pp 103–147. Ed. JRW Masters. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1991.

AMERICAN CANCER SOCIETY [homepage na internet]. Disponível em: [HTTP://www.cancer.org](http://www.cancer.org). Acesso em 04 de outubro de 2017.

GLOBOCAN [homepage na internet]. Disponível em: Acesso em 04 de outubro de 2017.

ILYAS, A. M. et.al. Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis. 2015. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/S1/S5>.

BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em: 04 de outubro de 2017.

HANAHAN D, WEINBERG R. Hallmarks of câncer: the next generation. *Cell*. Elsevier inc.; 2011;144:646-74.

TORRE LA, et.al. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin*; 2015.

BRASSEUR K, GÉVRY N, ASSELIN E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget*. 2017; 8:4008–4042. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14021>.

LU C, SHERVINGTON A. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem*. 2008; 312:71–80.

HOFFBRAND, A.V. MOSS, P.A.H. **Fundamentos em hematologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ABRALE. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. **Leucemia Mieloide Crônica**. [2015]. Disponível em:< <http://www.abrale.org.br/pagina/leucemia-mieloide-cronica-lmc>>.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, NCCN. Guidelines, 2017. Disponível em: <https://www.nccn.org/>

SANTOS, D. N. S. **Células estaminais do cancro do endométrio**. 2012. Dissertação de mestrado. . Disponível em:< <http://hdl.handle.net/10316/22663>.

Herzog TJ, Krivak TC, Fader AN, Coleman RL. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall survival in primary ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* (2010) **203**(1):e1–6. doi:10.1016/j.ajog.2010.01.059

ABE S, KUBOTA T, MATSUZAKI SW, OTANI Y, WATANABE M, TERAMOTO T, ET AL. Chemosensitivity test is useful in evaluating the appropriate adjuvant cancer chemotherapy for stage III non-scurrhous and scirrhus gastric cancers. *Anticancer Res* (1999) **19**(5C):4581–6.

KABESHIMA Y, KUBOTA T, WATANABE M, HASEGAWA H, FURUKAWA T, KITAJIMA M. Clinical usefulness of chemosensitivity test for advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* (2002) **22**(5):3033–7.

MICHALSKI CW, ERKAN M, SAULIUNAITE D, GIESE T, STRATMANN R, SARTORI C, et al. Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer. *Br J Cancer* (2008) **99**(5):760–7. doi:10.1038/sj.bjc.6604528

HELOMICS, 2017. Disponível em: <https://www.helomics.com/chemoresponse>.

NAGOURNEY CANCER INSTITUTE, 2017. Disponível em: <https://www.nagourneycancerinstitute.com/>.

DOERLER M, HYUN J, VENTEN I, POTTHOFF A, BARTKE U, SEROVA K, et al. Does chemosensitivity-assay-directed therapy have an influence on the prognosis of patients with malignant melanoma stage IV? A retrospective study of 14 patients with malignant melanoma stage IV. *Eur J Med Res* (2007) **12**(10):497–502. 86.

MOLLGARD L, TIDEFELT U, SUNDMAN-ENGBERG B, LOFGREN C, PAUL C. In vitro chemosensitivity testing in acute non lymphocytic leukemia using the bioluminescence ATP assay. *Leuk Res* (2000) **24**(5):445–52. doi:10.1016/S0145-2126(00)00003-5

KAWAMURA H, IKEDA K, TAKIYAMA I, TERASHIMA M. The usefulness of the ATP assay with serum-free culture for chemosensitivity testing of gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* (1997) **33**(6):960–6. doi:10.1016/S0959-8049(97)00075-0

ALFAROUK, K. O. et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell Int**, v. 15, p. 71, 2015. ISSN 1475-2867.

SCHRAG D, GAREWAL HS, BURSTEIN HJ, SAMSON DJ, VON HOFF DD, SOMERFIELD MR; ASCO Working Group on Chemotherapy Sensitivity and Resistance Assays. American Society of Clinical Oncology Technology Assessment: chemotherapy sensitivity and resistance assays. 2004 *J Clin Oncol*. **22** 3631-8.

EDEN T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treatment Reviews*.2010; 36: 286–297.

FRUEHAUF. JP. In vitro assay-assisted treatment selection for women with breast or ovarian cancer, 2002. *Endocrine-Related Cancer* 9 171–182.

ZHAO, L. et.al. The MYB proto-oncogene suppresses monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells via transcriptional activation of its target gene GFI1. 2014.

MARSHALL GM, CARTER DR, et al. The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(4): 277–289.

MAXIMIANO, M. Quimioterapia. 2010. Trabalho de conclusão do Curso de Radiologia. Disponível em: <  
<http://www.cenapcascavel.com.br/cursosonline/artigos/radiol/MEIRE%20MAXIMIANO.pdf>>.

MILANI. R. Mapeamento de vias de sinalização envolvidas na resistência de células leucêmicas a quimioterápicos: uma abordagem computacional. 2013.

## **CURRICULUM VITÆ**

**SILVA, C. A.; ALVES, CAMILA**

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Camila Alves da Silva

Nascida em Araranguá, SC, Brasil, em 09 de julho de 1992.

**Endereço profissional:**

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratório de Câncer e Neurobiologia

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, Centro de Pesquisas Experimentais

Santana – Porto Alegre

90035-903, RS – Brasil

**Telefone profissional:** (51) 33597616 **E-mail:** eng.camilaalves@gmail.com

- 1. FORMAÇÃO:** Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

### **2. ESTÁGIOS:**

#### **Agosto 2012 – Setembro 2014: Estágio Voluntário**

Estágio voluntário realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade do Estado do Rio Grande do Sul na unidade da cidade de Novo Hamburgo, sob orientação da Prof. Dr. Jane Marlei Boeira.

**ATIVIDADES:** Participação nas linhas de pesquisa sobre genotoxicidade e estresse oxidativo com participação nos projetos: Avaliação do estresse oxidativo no tecido muscular do molusco terrestre *Helix aspersa* alimentado com alface orgânica e não orgânica; Genotoxicidade induzida por agrotóxicos

avaliada no molusco terrestre *Helix aspersa* (MÜLLER, 1774); Avaliação da genotoxicidade induzida por anti-sépticos bucais em células esfoliadas da mucosa oral sob responsabilidade da orientadora Dr. Jane Marlei Boeira.

Os projetos envolveram coletas de campo dos materiais em estudo, cirurgia e cuidados com animais bioindicadores *Helix aspersa*, avaliações celulares e domínio de produção e avaliação de lâminas. Além disto entrevistas com produtores rurais e trabalhos de conscientização sobre uso de agrotóxicos.

### **Setembro de 2014 – Fevereiro de 2015: Estágio voluntário**

Estágio voluntário no grupo de Centro de Estudos em Biorrefinaria sob orientação do Prof. Dr. Fernando Santos.

ATIVIDADES: Revisão da literatura e escrita de projetos sobre produção de biocombustíveis de segunda geração e aproveitamento total a partir de biorrefinarias de subprodutos abundantes na agricultura do estado.

### **Janeiro de 2015 – Junho de 2015: Bolsista FAPERGS**

Participação no projeto de extensão Pedagogias da Igualdade: Uergs e comunidade no combate a desigualdade de gênero sob orientação da Prof. Dr. Martha Giudice Narvaz.

ATIVIDADES: Elaboração de cartilhas para distribuição em reuniões e encontros de mulheres e crianças nas escolas e centros comunitários, Organização de práticas didáticas e interativas para conscientização e combate as desigualdades de gênero; organização de eventos; planilhas de prestação de contas e organização financeira do projeto junto as agências de fomento eram algumas das atividades desenvolvidas sob orientação da Prof. Dr. Martha Giudice Narvaz.

### **Fevereiro de 2015 - Julho de 2015: Estágio Curricular**

Estágio na empresa Ziel Biosciences Pesquisa, *desenvolvimento e inovação* na área da oncologia e saúde da mulher, sob orientação da Dr. Caroline Brunetto de Farias.

ATIVIDADES: Acompanhamento e realização de procedimentos na área laboratorial, padronização de cultivos primários, padronização de técnicas para avaliação de quimiorresistência *in vitro*, organização de compras e planilhas financeiras, entre outras atividades relacionadas a organização financeira e prestação de contas.

### **3. PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

Acadêmico Destaque em Pesquisa na Área das Ciências da Vida e do Meio Ambiente., Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

### **4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

PINHEIRO, KELLY V. ; **ALVES, CAMILA** ; BUENDIA, MARIENELA ; GIL, MIRELA S. ; THOMAZ, AMANDA ; SCHWARTSMANN, GILBERTO ; DE FARIAS, CAROLINE BRUNETTO ; ROESLER, RAFAEL . Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. NEURO-ONCOLOGY, v. 19, p. now199, 2017.

SANTOS, F. A. ; EICHLER, P. ; SCHMITZ, G. K. ; ZERBIN, P. ; **SILVA, C. A.** ; TOLEDO, M. ; RIES, L. ; BORGES, F. G. . Estado da arte de processos envolvidos na produção do Biometanol a partir da biomassa lignocelulósica. QUIMICA NOVA, v. 38, p. 836-841, 2015.

### **7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

**ALVES, CAMILA**; PINHEIRO, K. V. ; GIL, MIRELA S. ; BUENDIA, MARIENELA ; DE FARIAS, CAROLINE BRUNETTO ; OLGUINS, D. B. ; CORNELIO, D. B. ; ROESLER, R. . CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DE RESISTÊNCIA TUMORAL A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BUENDIA, MARIENELA ; THOMAZ, AMANDA ; PINHEIRO, K. V. ; **SILVA, C. A.** ; FARIAS, C. B. ; ROESLER, RAFAEL . AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DE BUTIRATO DE SÓDIO E TYRPHOSTIN AG1478 NA PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PINHEIRO, KELLY V. ; **ALVES, CAMILA** ; GIL, MIRELA S. ; BUENDIA, MARIENELA ; FARIAS, C. B. ; ROESLER, RAFAEL . EFEITO DO BLOQUEIO SELETIVO DE EGFR EM GLIOBLASTOMA MULTIFORME. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PINHEIRO, K. V. ; **ALVES, CAMILA** ; GIL, MIRELA S. ; BUENDIA, MARIENELA ; THOMAZ, A. C. G. ; FARIAS, C. B. ; ROESLER, RAFAEL . EFFECT OF TrkB SELECTIVE BLOCKADE IN A172 GLIOBLASTOMA CELLS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**SILVA, C. A.**; HERNANDES, K. ; BOEIRA, J.M. . Avaliação da Apoptose, em células esfoliadas da mucosa oral, induzida por antissépticos bucais. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

**SILVA, C. A.**; HERNANDES, K. ; BOEIRA, J.M. . Avaliação da peroxidação lipídica no tecido muscular e na glândula digestiva do molusco *Helix aspersa* alimentados com alface orgânica e não orgânica. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

**SILVA, C. A.**; HERNANDES, K. ; BOEIRA, J.M. . Avaliação do estresse oxidativo no tecido muscular do molusco terrestre *Helix aspersa* alimentado com alface orgânica e não orgânica. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).



## **Anexo 1**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O menor pelo qual você é responsável está sendo convidado a participar da pesquisa “CHEMOBIOGRAM: AVALIAÇÃO DE QUIMIORRESISTÊNCIA DE TUMORES IN VITRO”

Por favor, leia atentamente este termo de consentimento livre e esclarecido. Use o tempo necessário para lê-lo e para perguntar tudo o que desejar. Se houver quaisquer palavras ou informações que não estiverem claras, a equipe do estudo se dispõe a explicá-las para você.

#### **INTRODUÇÃO**

Você foi informado de que o menor pelo qual você é responsável foi diagnosticado com câncer. O médico responsável informou que o tratamento inclui quimioterapia e/ou terapia biológica e que coletas de sangue, medula óssea ou tecido podem acontecer durante o tratamento para acompanhar o estado de saúde.

#### **OBJETIVO DA PESQUISA**

Os pacientes podem responder de maneira diferente aos tratamentos, por isso queremos estudar a resposta de cada indivíduo.

#### **PROCEDIMENTOS DE PESQUISA**

Se você concordar que o menor pelo qual você é responsável participe deste estudo, iremos pedir sua autorização para que possamos retirar uma pequena quantidade de sangue periférico e/ou medula óssea e/ou tecido do tumor no momento em que um exame de rotina ou biópsia/cirurgia seja solicitado.

#### **POTENCIAIS RISCOS E DESCONFORTOS**

O procedimento usado para a coleta de sangue periférico e/ou medula óssea será o utilizado rotineiramente. A retirada da quantidade a mais de material necessária à realização do estudo não trará nenhum efeito adverso. Para os tumores sólidos, não será realizado nenhum procedimento invasivo adicional para o estudo. Apenas será obtida uma pequena amostra de tecido que já será coletada pelo cirurgião ou radiologista no momento da biópsia ou cirurgia.

### **POTENCIAIS BENEFÍCIOS**

Não oferecemos benefícios diretos a você. Porém, os resultados desta pesquisa podem ajudar muitos pacientes com câncer no futuro.

### **COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO EM CASO DE DÚVIDA**

No caso de qualquer dúvida ou necessidade você poderá entrar em contato com a pesquisadora Daniela Baumann Cornelio pelo telefone: 51 – 3217-8424 ou email: [dbcornelio@gmail.com](mailto:dbcornelio@gmail.com)

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um dos participantes no estudo, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ernesto Dornelles: Av. Ipiranga, 1801, 11º andar, Sala 03 Fone: (51)3217.8840, das 8:30 às 12:00hs e das 14:00 às 17:30hs, de segunda a sexta-feira. Email: [cep@hed.com.br](mailto:cep@hed.com.br).

### **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A participação nesta pesquisa é voluntária. O atendimento médico que o menor recebe ou venha a receber na instituição não será afetado caso você decida não participar da pesquisa ou se desistir após iniciar a participação. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e o participante não terá nenhuma despesa decorrente da participação.

### **CONFIDENCIALIDADE**

Os dados deste estudo podem ser publicados. Entretanto, os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Foram elaboradas duas vias desse termo, sendo uma delas entregue ao participante/responsável e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

---

Nome do participante

---

Assinatura do participante

---

Nome do responsável

---

Assinatura do responsável

---

Nome do pesquisador

---

Assinatura do pesquisador

Local e Data: \_\_\_\_\_.